FLUORESZENZ-MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN DER ENTWICKLUNG UND DES VERLAUFES RETINOTECTALER NERVENFASERN IM HÜHNEREMBRYO

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der

Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

SOLON THANOS

aus

Paleokaria/Griechenland

1983

FLUORESZENZ-MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN DER ENTWICKLUNG UND DES VERLAUFES RETINOTECTALER NERVENFASERN IM HÜHNEREMBRYO

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der

Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

SOLON THANOS

aus

Paleokaria/Griechenland

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 5.5.1983

Dekan: Prof. Dr. K.-P. Hadeler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Gierer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-U. Schnitzler

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Dr. Friedrich Bonhoeffer am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen. Ich danke an erster Stelle Herrn Dr. Bonhoeffer für die Überlassung des Themas, für die anregenden und kritischen Diskussionen sowie für experimentelle Hilfe während der Durchführung der Arbeit. Herrn Dr. Alfred Gierer danke ich für die kritischen Diskussionen, die bei der theoretischen Interpretation der experimentellen Befunde und bei der Planung weiterführender Experimente sehr hilfreich waren. Experimentell weiterführend waren auch die Diskussionen mit Dr. H. Fujisawa, an den ebenfalls mein besonderer Dank gerichtet ist. Zu Dank verpflichtet fühle ich mich ferner Dr. Wolf Reckhaus für seine Mithilfe bei der Duchführung von Teilen der Arbeit, Dr. Sigrid Henke-Fahle für die Einführung in die Kultivierunstechnik der Embryonen, den Mitarbeitern des Fotolabors und allen Mitarbeitern der Abteilung I für ihre praktischen Hinweise und Diskussionen während der Durchführung der Arbeit. Frau Klara Ralinofsky danke ich für ihre geduldige Mitarbeit bei der mühsamen Anfertigung des getippten Manuskriptes und der Reinschrift der Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0016

Renate und Melissa gewidmet

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	9
	1. Material	9
	2. Methoden	11
	2.1. Langzeitkultivierungen von Hühner-Embryonen *in vitro*	11
	2.1.1. Vorbereitung der Eier und der Kulturbedingungen	12
	2.1.2. Herstellung von *in vitro* Langzeitkulturen	12
	2.1.3. *In ovo* lebende Kontrollembryonen	12
	2.2. Anterograde Markierungsmethoden von retinotectalen Axonen *in vivo*	13
	2.2.1. Anterograde Rhodamin-Markierung der ganzen retinotectalen Projektion	13
	2.2.1.1. Herstellung der Lösung für Färbung der gesamten Retina	13
	2.2.1.2. Intravitreale RITC-Injection	13
	2.2.2. Lokale Rhodaminfärbung retinaler Bereiche mit RITC-Kristallen	14
	2.2.3. Anterograde Meerrettichperoxidase(HRP)-Markierung	15
	2.3. Regrograde Färbung des retinotectalen Systems *in vivo*	15
	2.3.1. RITC-Applikation im Tectum und im optischen Trakt	15
	2.3.2. Nuclear Yellow(Hoechst 5769121)-Applikation im Tectum	16

Seite

2.4. Intratectale Transplantation embryonaler Retina in vivo 16

2.4.1. Vorbereitung der Empfängerembryonen; Enukleation in der frühen Embryonalentwicklung 16

2.4.2. Aufbereitung und Färbung der Retina-Transplantate 17

2.4.3. Herstellung einer rhodamingefärbten retinalen Zellsuspension für intratectale Injektion 18

2.4.4. Durchführung der intratectalen Retina-Transplantation 18

2.5. Mikrochirugische Ablenkung wachsender retinotectaler Fasern während der Embryonalentwicklung in vivo 19

2.6. Präparationsmethoden von embryonalem Gewebe für die Fluoreszenzmikroskopie 21

2.6.1. Fluoreszenzmikroskopie in vivo 21

2.6.2. Intrakardiale Perfusion 22

2.6.3. Herstellung von tectalen und retinalen Totalpräparaten 22

2.6.4. Präparation des optischen Chiasmas in der frühen Embryonalentwicklung 23

2.6.5. Herstellung von Gefrierschnitten und Paraffinschnitten von fixiertem Material 24

2.7. Meerrettich-Peroxidase(HRP)-Histochemie 25

2.7.1. Präparation HRP-enthaltenden Materials 25

2.7.2. Herstellung des Diaminobenzidin(DAB)-Wasserstoffperoxid(H_2O_2)Gemisches und HRP-Nachweis-Reaktion 25

2.8. Mikroskope - Kameras - Videomaterial 26

Seite

2.8.1. Fluoreszenzmikroskopie für Rhodamin und Nuclear Yellow 26

2.8.2. Mikroskopie von HRP-positivem Material 26

III. ERGEBNISSE 27

1. Entwicklung der Hühnerembryonen *in vitro*; Vergleich mit *in ovo* wachsenden Embryonen 27

2. Bidirektionale Markierung des wachsenden retinotectalen Systems mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Rhodamin-B-Isothiocyanat (RITC) 31

2.1. Anterograder Rhodamin-Transport nach intravitrealer Injektion 33

2.2. Anterograder Rhodamin-Transport nach lokaler RITC-Applikation in der Retina 36

2.3. Retrograder Rhodamin-Transport vom Tectum in die Retina 38

2.4. Auswachsende, mit Rhodamin gefärbte Neuriten aus intratectal implantierten Retinatransplantaten 41

3. Retrograde Markierung des retinotectalen Systems mit em Fluoreszenz-Farbstoff Nuclear Yellow (Hoechst 5769121) 41

4. Anterograder Meerrettich-Peroxidase(HRP)-Transport im retinotectalen System des Hühnerembryos 42

5. Die Normalentwicklung der retinotectalen Projektion beim Hühner-Embryo 45

5.1. Entwicklung der kontralateralen Projektion 45

5.1.1. Retinotopie der kontralateralen Projektion im optischen Nerven und im opti-Trakt 50

5.1.2. Zentral-periphere Organisation von Fasern aus der temporalen Retinahälfte 57

6. Experimentelle Ablenkung wachsender retinotectaler Fasern auf dem Tectum 66

7. Transplantation von retinalem Gewebe in nichtinnerviertes Tectum 74

Seite

7.1. Morphologie auswachsender Neuriten auf dem Tectum 76

7.2. Nasale Retinatransplantate 78

7.3. Temporale Retinatransplantate 83

7.4. Transplantate in der Mitte der antero-posterioren-Achse 88

7.5. Dorsale und ventrale Retinatransplantate 90

7.6. Einzelne Retinazellen auf dem Tectum 91

7.7. Zusammenfassung der Transplantations-ergebnisse 92

8. Bildung und Eliminierung von transienten Projektionen der Retina während der Embryonalentwicklung 93

8.1. Projektion der Retina auf das ipsilaterale Tectum in der Normalentwicklung 93

8.1.1. Ursprung der "normalen" ipsilateralen Projektion in der Retina 95

8.1.2. Quantität der ipsilateralen Fasern und Verteilungsmuster auf dem Tectum 96

8.1.3. Retinotopie der Projektion 99

8.1.4. Bilden kontralaterale retinotectale Axone am Chiasma opticum transiente Kollaterale zum ipsilateralen Tectum? 101

8.1.5. Elimination der ipsilateral wachsenden Axone 109

8.2. Projektionen der Retina auf dem ipsilaterale Tectum in monocularen Embryonen 111

8.2.1. Ursprung und Quantität der "abnormalen", ipsilateralen Projektion 115

8.2.2. Wird in monocularen Embryonen auch die "normale" ipsilaterale Projektion gebildet? 116

8.3. Eliminatonsmechanismen von "falschen" Projektionen auf das Tectum 116

Seite

8.4. Andere Verbindungen der Retina zum Mittelhirn 118

8.4.1. Gibt es eine transiente Retinaprojektion auf den isthmo-optischen Nucleus? 119

IV. DISKUSSION 124

V. ZUSAMMENFASSUNG 138

VI. LITERATURVERZEICHNIS 140

LEBENSLAUF 145

I. EINLEITUNG

Trotz der physiologischen, anatomischen und histologischen Daten, die im Laufe der letzten hundert Jahre über das Nervensystem gesammelt wurden, sind sowohl die hochkomplexe Struktur und Funktion als auch die Phylogenie und Ontogenie des zentralen Nervensystems (ZNS) noch weitgehend unverstanden. Zu den Modellsystemen, die wegen ihrer Bedeutung für den Gesamtorganismus und wegen ihrer experimentell zugänglichen Lage innerhalb des ZNS untersucht wurden, gehört das visuelle System verschiedener Tierarten.

Die Retina ist ein ontogenetisch aus dem Zwischenhirn entstandener extrakranialer Teil des ZNS und vermittelt visuelle Informationen über eine Reihe intraretinaler, neuronaler Umschaltstationen an das Gehirn. Die retinalen Ganglienzellen (als letzte Umschaltstation) senden Axone aus, die in ihrer Gesamtheit (1 bis 2.5 Millionen) als optischer Nerv die Retina verlassen; sie kreuzen am Chiasma opticum - quantitativ je nach Tierart unterschiedlich - zur kontralateralen Hirnseite und bilden dort den optischen Trakt, der wiederum je nach Tierart auf unterschiedlichen Strukturen des Thalamus und des Mittelhirns endet. Im Zielgebiet gehen die retinalen Ganglienzellaxone synaptische Verbindungen mit Zellen des Zielgebietes ein. Es ist noch unbekannt, wieviele Synapsen ein Ganglionzellaxon bildet und mit wievielen Zielgebietszellen es diese Verbindungen eingeht.

Bei niederen Vertebraten (Fischen, Amphibien, Vögeln) stellt das Dach (Tectum) des Mittelhirns die intrakraniale Endstation für die retinalen Axone dar und fungiert

gleichzeitig als Endstation der visuellen Bahn. Es hat assoziative Funktionen zwischen den ankommenden visuellen Signalen und Afferenzen, die über andere Bahnen (taktile Bahn, Schmerzbahn, akustische Bahn) in das Mittelhirn gelangen (Huber und Crosby, 1929; Cowan et al., 1961). Bei höheren Vertebraten (Nagetieren, Säugern) wird die visuelle Information von den Ganglienzellaxonen im Corpus geniculatum laterale (CGL) des Thalamus auf Interneurone synaptisch umgeschaltet, deren Axone dann als Radiatio optica die Information hauptsächlich zum visuellen Zentrum im caudalen Cortex weiterleiten. Der visuelle Cortex (Vorderhirn) übernimmt somit bei höheren Vertebraten assoziative Funktionen, die bei niederen Vertebraten vom Tectum opticum (Mittelhirn) durchgeführt werden.

Charakteristisch für die Projektion der Umwelt auf die verschiedenen assoziativen Hirnregionen und gemeinsam für alle Sinnesmodalitäten ist die somatotope Projektion. Im visuellen System wird die von der Retina aufgenommene Information topographisch (= retinotop) auf das jeweilige visuelle Zentrum weitergeleitet. Diese Definition der Retinotopie schließt mit ein, daß benachbart liegende Bereiche in der Retina mit entsprechend benachbarten Regionen im visuellen Zentrum neuronal verbunden sind. Eine retinotope Projektion in diesem Sinne konnte mit unterschiedlichen Methoden (Polyak, 1957) in allen untersuchten Vertebratenarten nachgewiesen werden. In niederen Vertebraten wird die Retina spiegelbildlich auf das Tectum projiziert, so daß dorsal liegende Retinaaxone im ventralen Tectum und ventrale Retinaaxone im dorsalen Tectum endigen. In ähnlicher Weise spie-

gelbildlich ist die Retinaprojektion entlang der nasotemporalen Augenachse, wobei nasale Retinaaxone im posterioren (caudalen) und temporale Retinaaxone im anterioren (rostralen) Tectum endigen (Crossland et al., 1975; Crossland and Ushwat, 1979; Delong and Coulombre, 1965). Ähnliche Retinotopieverhältnisse finden sich in der Projektion der Retina auf das Corpus geniculatum laterale (CGL) und des CGL auf den visuellen Cortex bei höheren Vertebraten (Polyak, 1957).

Auf das visuelle System höherer Vertebraten wird an dieser Stelle nicht weiter eingegangen, während auf das retinotectale System von Fischen und Amphibien Bezug genommen wird, wenn Vergleiche zum retinotectalen System der Vögel (Gegenstand der vorliegenden Arbeit) notwendig erscheinen.

Das adulte visuelle System der Vögel weist folgende morphologisch-anatomische Besonderheiten auf: a) die gesamte Zahl (ca. 2,5 Millionen beim Huhn) der retinotectalen Axone kreuzen im Chiasma opticum zur kontralateralen Hirnseite, d.h. das von der Retina auf das Tectum projizierte Bild bei den Vögeln keine binoculare Überlappung beider Gesichtsfelder, wie dies z.B. beim Menschen der Fall ist (Polyak, 1957). b) Das System ist nicht regenerationsfähig wie das retinotectale System von Fischen und Amphibien (Sharma, 1972; Jacobson, 1978; Fujisawa, 1981). c) Im visuellen System der Vögel existiert eine zentrifugale Verbindung zwischen dem isthmo-optischen Nucleus (ION) im Mittelhirn und der amakrinen Zellschicht der Retina (Cowan, 1970; Clarke and Cowan, 1978). Auch die Entwicklung des retinotectalen Systems der Vögel verläuft anders als bei anderen niederen

Vertebraten (Jacobson, 1978): Retinazellen und Tectumzellen differenzieren sich zunächst unabhängig voneinander. Danach werden von den Retina-Ganglienzellen Axone ausgesandt, die mit ausdifferenzierten Tectumzellen Verbindungen eingehen. Der Prozeß der Differenzierung und Etablierung der retinotectalen Verbindung läuft relativ rasch ab (Entwicklungstag 3-13; Rager, 1980). Bei Amphibien erstreckt sich die Entwicklung der Projektion über längere Zeit und bei Fischen über ihr ganzes Leben, da das optische System ständig wächst. Während dieser Zeit sind Amphibien und Fische sehfähig. Die anfängliche Projektion, die retinotop organisiert ist, wird bei Fischen und Amphibien erweitert, indem in der Retina neue Ganglienzellen am peripheren Umfang entstehen und Axone in das Tectum aussenden, das in einem von ventro-rostral nach dorso-caudal verlaufenden Gradienten an Größe zunimmt. Ein solches System bringt mit sich, daß vorhandene Verbindungen abgebaut und neu formiert werden müssen (Sharma, 1972; Scalia and Fite, 1974; Jacobson 1978; Fujisawa, 1981). Beide Systeme sind, wie erwähnt, in ähnlicher Weise retinotop organisiert. Deshalb sind die prinzipiellen Fragen nach der Entstehung des retinotectalen Systems gleich. Im Folgenden wird am Modell des Hühner-Embryos versucht, solche Fragen hervorzuheben.

Die Frage, wie Retinotopie auf dem Tectum zustandekommt, kann unterteilt werden:

1) Wie finden Axone ihren Weg bis zum Tectum und
2) wie finden die Axone auf dem Tectum ihr richtiges Projektionsgebiet?

Beide Fragen, die übrigens nicht nur für das retinotectale System, sondern für jede neuronale Projektion gelten, sind so alt wie die Neuroembryologie selbst. Zu der Wegfindung von Fasern sind eine Reihe von Theorien entwickelt worden: a) Nach der Stereotropismus-Vorstellung von Loeb (1902) und von Weiss (1941) als Kontaktführung bezeichneten Theorie richten sich auswachsende Fasern an mechanischen Strukturen aus. Dieser Theorie gegenüber steht die Chemotropismus-Vorstellung (Forsman, 1900; Ramon y Cajal, 1910), nach der wachsende Fasern über "Lockstoffe" geleitet werden. Einige Jahrzehnte später wurde von Sperry (1963) die Chemoaffinitätstheorie als allgemeines Prinzip entworfen. Nach dieser Theorie sind die Nervenzellen und ihre Axone mit Markierungen versehen, die von gleichen oder von komplementären Markierungen der Zellen im Zielgebiet erkannt werden.

Die allgemein verfaßte Chemoaffinitätstheorie konnte in dieser Form bis heute noch nicht experimentell verifiziert werden. Nach dieser Theorie wurden weitergehende, genauer formulierte Modelle entwickelt. Willshaw und von der Malsburg (1979) formulierten ein Modell, nach dem sich wachsende Fasern gegenseitig entlang ihrer Länge erkennen und sich räumlich orientieren. Rager (1979, 1980) nimmt an, daß die Ankunftszeit von Fasern auf dem Tectum ausreicht, um eine geordnete Projektion zu bekommen. Eine Theorie, die nicht diffusible, sondern mehr adhäsive Positionsspezifität gradiert vorkommender Faktoren mit gegenseitiger Hemmung von Synapsenbildung wurde von Fraser (1980) entworfen. Gierer (1981) entwickelte eine Theorie, in der ein "Führungsparameter" mit einem bestimmten Verteilungsmuster auf dem Zielge-

biet vorkommt. Dieser Führungsparameter wird aus Komponenten der wachsenden Axonspitzen und des Zielgewebes zusammengesetzt, und im einfachsten Fall stellt er eine gradiert verteilte Substanz dar. Somit wächst eine im Zielgebiet ankommende Faser entsprechend der Position ihres Zellkörpers in der Retina entlang eines Gradienten, bis die Verteilung der gradierten Substanz auf der Axonspitze und auf der Zielzelle sich entsprechen.

Wichtig für die Verifizierbarkeit sowohl der mehr "mechanischen" oder auch der mehr zur "Chemoaffinität" neigenden Modelle wären Antworten auf die Fragen: "Wie ist das adulte retinotectale System entlang der visuellen Bahn organisiert?" und "Wie ist das embryonale retinotectale System organisiert?"

Die erste Frage nach der retinotopen Anordnung von Fasern innerhalb des optischen Nerven, des Chiasmas und des optischen Traktes im adulten visuellen System wurde bei einigen Tierarten studiert. Fawcett (1980) und Fujisawa (1981) fanden, daß bei Amphibien die retinalen Axone aus allen vier retinalen quadranten im optischen Nerven retinotop organisiert sind und vorgeordnet in das Tectum gelangen. Scholes (1979) fand eine ähnliche retinotope Anordnung bei Fischen, wobei er Umordnungen von Fasern innerhalb des optischen Nerven beobachtete. Horton et al. (1979) erreichten im visuellen System der Katze eine neue Genauigkeitsebene, indem sie einige retinale Ganglienzellen retrograd vom Corpus geniculatum laterale aus mit Meerrettich-Peroxidase markierten. Sie fanden, daß Nachbarschaftsbeziehungen auf Faserebene im optischen Nerven aufgegeben werden, und inter-

pretierten ihren Befund so, daß das visuelle System auf Faserebene nicht retinotop organisiert sei. Alle beschriebenen Befunde sind am adulten visuellen System gemacht worden. Die Frage, ob auch während der Enwicklung des visuellen Systems retinotope Verhältnisse innerhalb des optischen Nerven und des optischen Traktes existieren, konnte bis heute wegen experimenteller Limitierungen nicht beantwortet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein embryonales System wachsender Hühnerembryonen eingeführt, das den Embryo experimentell zugänglich macht, weil er außerhalb der Eierschale am Leben gehalten wird. An diesem embryonalen System wurden in vivo Fluoreszenzmarkierunsmethoden für das wachsende retinotectale System enwickelt und in Kombination mit bekannten Markierungsmethoden (Meerrettich-Peroxidase) zu Untersuchungen folgender Aspekte der Entwicklung des retinotectalen Systems angewandt:

a) Ist das wachsende retinotectale System während der Entwicklung retinotop organisiert und, wenn ja, auf welcher Ebene (regional oder auf Faserebene) und nach welchen Prinzipien?

b) Reicht die retinotope Organisation innerhalb der visuellen Bahn aus, um auf dem Tectum eine präzise retinotope Projektion herzustellen, oder sind auf dem Tectum zusätzliche Faktoren daran beteiligt?

c) Um solche "tectale" Faktoren in vivo zu erfassen, wurden erstens Transplantationen embryonaler Retina auf das Tectum durchgeführt und

d) zweitens wachsende retinotectale Fasern *in vivo* von ihrem normalen Weg mechanisch abgelenkt und in ihrem weiteren Verlauf untersucht.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

Materialien und Geräte für die Untersuchung zur retinotectalen Projektion an in vitro kultivierten Hühnerembryonen werden aufgeführt. Chemikalien, bei denen die Firma nicht angegeben ist, stammen von Merck, Darmstadt.

Desinfektionsmittel für die Eier und Instrumente:

SPITACID^{R}. Gebrauchsfertiges Händedesinfektionsmittel, bestehend aus: 46 g Alkohol
27 g Isopropylalkohol (100%ig) und
1 g Benzylalkohol
pro 100 g;
hergestellt von Henkel & Cie., Düsseldorf.

DMEM (Dulbecco´s modified Eagle´s Medium)

Hank´s Salzlösung (ohne Ca^{++} und ohne Mg^{++}:

	g/Liter
NaCl	8,0
KCl	0,4
KH_2PO_4	0,06
$Na_2PO_4.2H_2O$	0,06
Glucose	1,0
$NaHCO_3$	0,35
Hepes-Puffer	(20 mM)
Phenolrot	0,01 mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,1):

	g/Liter
NaCl	8,0
KCl	0,2
KH_2PO_4	0,2
$Na_2HPO_4.2H_2O$	1,15
$MgSO_4.7H_2O$	0.1
$CaCl_2.2H_2O$	0,1

Chicken-Lösung, ungepuffert:

	g/Liter
NaCl	7,0
KCl	0,42
$CaCl_2$	0,24

Inkubator: EHRET Kleinmotorbrüter Typ KMB V2.

Injektionsspritzen:

Glasmikrokanülen, hergestellt aus ausgezogenen Mikropipetten (10 µl, Brand)

10 ul Hamilton-Spritze (Ø 0,9 mm).

Fluoreszenzmikroskope:

ZEISS Axiomat Invers mit HBO 100 Quecksilber-UV-Lampe
ZEISS Universal mit HBO 50 Quecksilberlampe

Mikroskopieschalen:
Petriperm-Schalen (100x15 mm) (HERAEUS)

Membranfilter (für die Ausbreitung und Färbung von Retinas):
SARTORIUS Membranfilter Typ SM N 13006 (Sartorius GmbH, Göttingen)

Meerrettich-Peroxidase (EC.1.11.1.7) Type VI:
Reinheitsgrad 3 (RZ = OD 403 nm/175 nm) (SIGMA GmbH, München)

Merrettich-Peroxidase-Nachweis:

Diaminobenzidin (SIGMA GmbH, München; restliche Chemikaien von MERCK, Darmstadt)

Reaktionsmedium für Meerrettich-Peroxidase:

Reihenfolge		
1.	50 ml	0,05-0,25 mM Citrat-Ammoniumacetat-Puffer (pH 5,3)
2.	50 ml	H_2O dest. (auf 60°C aufwärmen)
3.	70 ul	P=Kresol
4.	30 ul	30 % H_2O_2-Lösung (0,01 % Endkonzentration)
5.	200 ul	Diaminobenzidinlösung aus 5 % Stammlösung, abkühlen auf Raumtemperatur

Citrat-Ammoniumacetat-Puffer (für HRP-Nachweis-Reagens):

Stammlösungen: 0,2 M Citrat in H_2O dest.
0,2 M NH_4-Acetat in H_2O dest.

Beide Stammlösungen werden jeweils verdünnt, daß

50 mM Citrat und
50 mM NH_4Acetat in H_2O dest. entsteht.

Von diesen Lösungen wird unter pH-Kontrolle so viel Ammoniumacetat zu Citrat gegeben, bis sich ein pH-Wert von 5,0 einstellt.

Rhodamin-B-Isothiocyanat (RITC) Nr. R-9877, Grade II (SIGMA, München)

Fixiermittel:

a) Bodian´s Fixativ (Bodian, 1937):
5 ml aus 37 % Formalinlösung
\+ 5ml Essigsäure
\+ 90 ml 80 % Äthanol

b) 4 % Paraformaldehydlösung in PBS, pH 7,1, hergestellt aus Paraformaldehyd-Pulver, Erwärmung auf 60°C für eine Stunde und mit NaOH auf pH 7,8-8 eingestellt.

2. Methoden

2.1. Langzeitkultivierung von Hühner-Embryonen in vitro

Auerbach et al. (1974) entwickelten das in dieser Arbeit benutzte embryonale System. Es wurde in unserem Labor modifiziert und für unsere Zwecke optimiert (Thanos, 1980).

2.1.1. Vorbereitung der Eier und der Kulturbedingungen

Befruchtete Hühnereier (HISEX weiß) wurden nach höchstens 10-tägiger Lagerung bei 10°C in einem Ehret-Kleinmotorbrüter (Typ KMB V2) bei 38°C und 75 % Luftfeuchtigkeit mit automatischer Drehung alle 6 Std. für 3 Tage vorinkubiert. Nach 3 Tagen wurden die Eier in einen Wärmeraum bei 38°C und Warmluftzirkulation umgesetzt. Nach Desinfektion der Eioberfläche mit Spitacid oder 70%igem Äthanol wurden die Eier für einige Minuten horizontal liegengelassen.

Sterile Plastik-Petrischalen (Falcon 20x100 mm) wurden am Vortag ohne Deckel in größere sterile Plastikschalen

gelegt (Falcon 25x150mm), die bis auf ca. 5mm mit sterilem Wasser gefüllt waren. Die großen Schalen wurden zugedeckt und mit Inhalt über Nacht im Wärmeraum stehengelassen.

2.1.2. Herstellung der in-vitro-Langzeitkulturen

Die vorbehandelten, 3 Tage alten Eier wurden an einer sterilen scharfen Metallkante an ihrer Unterseite aufgeschlagen, und der gesamte Inhalt jeweils eines Eies wurde vorsichtig in eine Petrischale gegeben. Dieser Schritt war entscheidend in der gesamten Prozedur, denn die Embryonen hatten wenig Überlebenschancen über den 4. oder 5. Entwicklungstag hinaus, wenn der Dotter verletzt wurde. Genauere Daten über Überlebensraten solcher Embryonen lassen sich bei Auerbach (1974) und Thanos (1980) finden. In den hier benutzten Embryonen-serien wurden keine Antibiotica zu den Kulturen hinzugegeben.

2.1.3. In ovo lebende Kontrollembryonen

Um festzustellen, inwieweit die in vitro wachsenden Embryonen und insbesondere deren retinotectales System mit in ovo wachsenden Embryonen vergleichbar sind, präparierten wir einige in ovo Kontroll-Embryonen. Sie stammten vom gleichen Eiertyp und wurden bis zum Entwicklungstag 3 wie unter 2.1.1. behandelt. In horizontaler Lage unter Seitendurchleuchtung, mit der die genaue Position des Embryos bestimmt werden konnte, wurde mit einer Nadel ein Loch in die Luftblase des Eies und ein zweites Loch durch die Eischale und Schalenmembran direkt neben dem sichtbaren Embryo auf der oberen Eiseite gestochen. Der Embryo sank durch Verlagerung der Luftblase an die durchstochene Stelle in die Tiefe.

Ein ca. 1 cm breites Fenster wurde durch die Eischale geöffnet, mit Tesafilm zugeklebt, und die Eier wurden wie die in vitro Embryo-Kulturen im Wärmeraum weiterinkubiert.

2.2. Anterograde Markierungsmethoden von retinotectalen Axonen in vivo

2.2.1. Anterograde Rhodaminmarkierung der ganzen retinotectalen Projektion

2.2.1.1. Herstellung der Lösung für Färbung der gesamten Retina

Eine von Bonhoeffer und Huf (1980, 1982) entwickelte Rhodaminfärbung für retinale Explantate in vitro wurde modifiziert und für in vivo-Markierung retinotectaler Axone verwendet. 3-4 mg Rhodamin-B-Isothiocyanat wurden in 20ul Dimethylsulfoxid aufgelöst, da es in Wasser und anderen Pufferlösungen schwerlöslich ist. Diese Lösung wurde unter starkem Rühren in 1ml destilliertem Wasser suspendiert. Die Lösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt und konnte über mehrere Wochen verwendet werden. Kurz vor jeder Verwendung wurde sie nochmals stark gerührt.

2.2.1.2. Intravitreale RITC-Injektion

In Kulturschalen oder in ovo wachsende Embryonen verschiedenen Alters (zwischen Entwicklungstag 3 und 16) wurden mit RITC-Lösung intravitreal injiziert. In Abhängigkeit vom Alter der Embryonen variierte die Menge des Injektionsvolumens zwischen 0,1 bis 0,2µl bei 3 Tage alten Embryonen und 6-7µl bei 10-12 Tage alten Embryonen. Die Injektion wurde

bei Embryonen vor dem 6. Tag mit Glaskanülen durchgeführt (hergestellt aus ausgezogenen Glasmikropipetten, Brand; Durchmesser an der Spitze 10-50µm). Die Kanüle wurde mit einem Gummischlauch an einer 80µl Plastikspritze befestigt. Bei über 6 Tage alten Embryonen wurde die Lösung mit einer 10ul Hamilton-Mikroliter-Spritze injiziert. Der Injektionsvorgang lief wie folgt ab:

Über dem Auge des Embryos wurden mit einer Mikropräparationsschere die Membranen vorsichtig aufgeschnitten, um größere Gefäßblutungen zu vermeiden. Die Glaskanüle oder Spritze wurde manuell in das Auge neben Linse und Ora serrata hineingeführt und die Farblösung in den Glaskörper injiziert, in dem der Farbstoff in gelöstem Zustand bleibt und diffusibel ist. Eine Injektion von 5ul dauerte etwa 3-4min. Die Schalen mit den Embryonen wurden abgedeckt und im Wärmeraum weiterinkubiert.

2.2.2. Lokale Rhodaminfärbung retinaler Bereiche mit RITC-Kristallen

Für eine Reihe von Experimenten (s. 5.1, 8.1, 8.2) war es notwendig, nicht die Gesamtzahl der retinotectalen Axone, sondern bestimmte retinale Bereiche und die aus ihnen stammenden Axone zu färben. Zu diesem Zweck eignet sich RITC besonders gut, da es in Wasser und in der embryonalen Flüssigkeit schwerlöslich ist. Nachdem das Auge des Embryo freipräpariert wurde (s. oben) wurden zusätzlich an einer bestimmten Stelle die Sclera und das Pigmentepithel mit einer Präpariernadel eröffnet und einige ungelöste RITC-Kristalle direkt auf die Retina an der Eröffnungsstelle mit einer feinen Drahtspitze appliziert. Dabei wurde darauf geachtet,

daß die Membrana limitans interna zwischen Retina und Glaskörper nicht verletzt wurde. Verletzungen der Membrana limitans interna führen zum Eindringen von RITC in den Glaskörper, zu einer unvermeidlichen Diffusion auf breite Retinabereiche und zu einer starken Hintergrundsfärbung.

2.2.3. Anterograde Meerrettich-Peroxidase(HRP)-Markierung

Aus Meerrettich-Peroxidase (EC 1:11.1.7; Typ VI, Reinheitsgrad 3; Sigma) wurde eine 20-30%ige Lösung in PBS, pH 7.1, hergestellt. 4 bis 5 µl dieser Lösung wurden mittels einer 10µl-Hamilton-Spritze oder eine Glaskanüle in das Auge von *in vitro* oder *in ovo* wachsenden Embryonen injiziert. Die embryos wurden bei gleichen Bedingungen weiterinkubiert.

2.3. Retrograde Färbung des retinotectalen Systems in vivo

2.3.1. RITC-Applikation im Tectum und im optischen Tract

Durch Applikation von Wasser-schwerlöslichen RITC-Kristallen auf das Tectum und auf dem optischen Trakt während der Entwicklung sollten in der Retina retrograd gefärbte Ganglienzellen identifiziert werden. Um die gesamte Retinafläche zu färben, wurden mit einem Skalpell entlang der dorsovenralen Achse auf dem anterioren Tectum oder auf dem optischen Trakt die Haut und die Meningen durchgeschnitten. Mit der Skalpellspitze wurden dann RITC-Kristalle in den Schnitt hinein appliziert. Wenn nicht die ganze Retina, sondern bestimmte Retinaquadranten gefärbt werden sollten,

so wurden lokal die Meningen mit einer spitzen Nadel durchstochen und das RITC lokal appliziert. Es wurde darauf geachtet, daß die Faserschicht, die direkt unter den Meningen liegt, nicht verletzt wurde.

2.3.2. Nuclear Yellow(Hoechst 5769 12l)-Applikation im Tectum

Nuclear Yellow (Hoechst 5769 12l) wurde als zweiter retrograder Marker neben RITC verwendet. Der Farbstoff ist in Wasser schwerlöslich (Bentivoglio et al., 1980) und eignet sich somit für intratectale Applikation. Die Prozedur war gleich wie beim RITC. Der Farbstoff fluoresziert im gelben Bereich (520 nm), nach Bestrahlung im blauvioletten Bereich (435 nm).

2.4. Intratectale Transplantation embryonaler Retina in vivo

2.4.1. Vorbereitung der Empfängerembryonen-Enukleation in der frühen Embryonalentwicklung

Embryo-Kulturen wurden, wie unter 2.1. beschrieben, angelegt. Einige Stunden später, meistens am Tag 3,5, jedoch nicht später als Tag 4, wurde den Embryonen das rechte Auge folgendermaßen operativ entfernt: Die Chorionmembran über dem Auge wurde unter dem Stereomikroskop eröffnet, mit einer feinen Pinzette wurde das entsprechende Auge an der Linse festgehalten und mit einer Präpariernadel vom umgebenden Gewebe freipräpariert und als ganzer Augenbecher entfernt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, daß größere Blutgefäße, die in diesem Entwicklungsstadium das Auge versorgen, schonend behandelt wurden, um stärkere Blutungen zu vermei-

den. Blutungen dieser Gefäße führen unvermeidlich zum schnellen Absterben der Embryonen innerhalb weniger Stunden. Die Geschwindigkeit bei der Präparation ist auch entscheidend, denn offen liegende Embryonen trocknen schnell aus. Deswegen darf an jedem Embryo nicht länger als 5 min präpariert werden. Die Embryonen wurden weiterinkubiert.

2.4.2. Aufbereitung und Färbung der Retinatransplantate

Um retinale Transplantate herzustellen, wurde die Explantations- und Rhodaminfärbe-Methode übernommen, die für in vitro-Systeme benutzt wird (Bonhoeffer und Huf, 1980, 1982; Kern-Veits, 1981). Die 6 Tage alte Retina wurde in Hank´s-Salzlösung präpariert, auf einem schwarzen Sartorius-Membranfilter ausgebreitet und mit der Pinzette fest auf den Filter angeheftet. Die Retina wurde 15 min lang mit RITC-getränkten Agarscheibchen gefärbt, wie von Kern-Veits (1981) beschrieben. Diese Färbemethode sieht so aus:

Ein Tropfen 1%iger Agar in Hank´s Salzlösung wird auf ein Glasplättchen gebracht (Ø 20 mm). Nach Erstarren wird die Agarschicht (0,2 mm) mit 100 µl einer RITC-Lösung (0,6mg RITC in 1000 µl DMSO) gefärbt (15 min). Die Agarscheibchen werden mit Hank´s Lösung gespült (20min, mehrfach ausgetauscht), um das DMSO auszuwaschen. Ein Agarscheibchen wird dann auf die mit der Faserschicht nach oben festgesaugten Retina gelegt, nach 15min abgenommen, und die Retina wird viermal mit Hank´s Lösung gespült. Anschließend wird die Retina 1-3 Std. in einem Inkubator (Typ 3156 Forma Scientific, Marietta, Ohio/USA) bei 37°C und 4 % CO_2 in Kulturmedium inkubiert, um Überschußfarbe zu entfernen.

Die Retina wurde im Kulturmedium in den Wärmeraum gebracht, in dem auch die Empfängerembryonen inkubiert wurden. Unter sterilen Bedingungen wurde die Retina aufgeteilt durch dorsoventral und nasotemporal verlaufende senkrecht aufeinander geführte Schnitte mit dem Skalpell in kleine Quadrate der Größe von ca. 0,01-0,04 mm^2.

2.4.3. Herstellung einer Rhodamin-gefärbten retinalen Zellsuspension für intratectale Injektionen

Sechs Tage alte Retina wurde präpariert, 10 min bei 37°C in RITC-Lösung gefärbt (wie unter 2.4.2. 1:1000 verdünnt), trypsiniert (2 mg/ml Trypsin, Sigma) gefärbt und mit einer Pasteurpipette (Ø 1mm) zerkleinert. Mit einer zweiten Pasteurpipette (Ø0,1mm) wurden daraus Einzelzellen gemacht durch 10- bis 15-maliges Ein- und Aussaugen in die Pipette. Das Trypsin und überschüssiges RITC wurden durch viermaliges Waschen in Hank´s Lösung (600xg, Christ-Zentrifuge) herausgewaschen. Das Sediment wurde in Hank´s Lösung aufgenommen (1 ml), und 2-3µl von dieser Suspension wurden injiziert.

2.4.4. Durchführung der intratectalen Retinatransplantation

Das zum entfernten Auge kontralaterale Auge (Abschn.6.1.) wurde zwischen Tag E6 und Tag E7 unter dem Stereomikroskop von darüberliegenden Membranen bis zum Subarachnoidalraum freipräpariert. Die direkt auf dem Tectum liegende Hirnhaut wurde nicht verletzt, größere Gefäßblutungen wurden vermieden. Wenn Blutungen größerer Gefäße auftraten, wurde das blutende Gefäß proximal von der blutenden Stelle mit einer Pinzette 2-3 min festgeklemmt. Unter einem

zweiten Stereomikroskop wurden quadratische Retinastücke (s. 6.2.) in Glaskanülen (ausgezogen aus 50µl-Kapillaren, Öffnung an der Spitze ca. 100 µm, schräggeschliffen) eingesaugt und unter die Hirnhaut auf bestimmte Stellen der Tectumoberfläche bei ständiger stereomikroskopischer Kontrolle vorsichtig appliziert. Die aufgeschnittene Dura mater und die Kopfhaut wurden über dem Tectum zurückgeklappt, und die Schale mit dem Embryo wurde abgedeckt und weiterinkubiert.

Kontrollembryonen ohne vorherige Augenentfernung sowie Embryonen, bei denen statt ganzer Retinatransplantate retinale Zellsuspension injiziert worden war, wurden gleich behandelt, wie oben beschrieben.

2.5. Mikrochirurgische Ablenkung der wachsenden retinotectalen Fasern während der Embryonalentwicklung in vivo

Um die Frage zu klären, was passieren würde, wenn man die retinotectalen Fasern aus ihrer anteroposterioren Wachstumsrichtung auf dem Tectum mechanisch ablenkt, wurde eine Methode entwickelt, mit der man parallel zu der anterograden Rhodamin- und HRP-Markierung der Fasern eine mechanische Barriere im Tectum einbaut, die den normalen Verlauf der Fasern verhindern und sie zu Umwegen auf dem Tectum "zwingen" soll.

In Kulturschalen wachsende Embryonen wurden zwischen tag E6 und E7 mit jeweils 3-4 µl RITC-Lösung in das rechte Auge injiziert. Die Embryonen wurden weiterinkubiert bis Tag E8 bzw. Tag E9. In einem zweiten Eingriff wurden die Embryo-

nen mit abgeschmolzenen stumpfen Pasteur-Pipetten so gedreht, daß das linke Tectum dem Experimentator zugewandt war. Über dem Tectum wurde unter dem Stereomikroskop alle Membranen und Häute bis auf die Pia aufgeschnitten.

Ein dreieckiges Teflonstückchen (ca. 0,15-0,2 mm Kantenlänge, Dicke 0,05 mm) wurde mit einer Pinzette in das Tectum so hineingepflanzt, daß die äußere Kante über der Tectumoberfläche noch sichtbar hinausragte.

Ähnlich wurden mit HRP anterograd gefärbte Embryonen behandelt mit dem Unterschied, daß hier zuerst das Hindernis eingebaut (Tag E7) und 3 bis 4 Tage später in das entsprechende Auge HRP injiziert wurde (Abschn. 4.).

In einigen Embryonen wurde statt des Teflon-Hindernisses eine ähnlich große Läsion ins Tectum gemacht, um zu testen, ob die Fasern fähig sind, über eine Läsion hinweg zu ihrem Zielgebiet zu wachsen.

Wie bei allen Eingriffen am lebenden Embryo wurden auch hier stärkere Blutungen vermieden. Zusätzliche Schwierigkeiten bereiteten hier die arachnoidalen Blutgefäße, die auch das Tectum mit Blut versorgen und deren Verletzung zu schweren Hämatomen im Tectum führt, die wiederum Deformationen des Systems verursachen.

Die Embryonen wurden in ihre ursprüngliche Lage zurückgedreht und für verschieden lange Zeiten, meistens zwischen 6 und 12 Std., in Einzelfällen 1-2 Tage, weiterkultiviert. Die HRP-markierten Embryonen wurden für 4-5 Tage nach der Teflonimplantation kultiviert.

2.6. Präparationsmethoden von markiertem embryonalem Nervengewebe für die Fluoreszenz-Mikroskopie

Embryonales Rhodamin-markiertes neuronales Gewebe wurde von den in Abs. 2.2.-2.5. behandelten Embryonen für Fluoreszenz präpariert.

2.6.1. Fluoreszenzmikroskopie in vivo

Anterograd gefärbte retinotectale Fasern konnten unter hochauflösender Fluoreszenz-Mikroskopie auf dem Tectum im lebenden Embryo beobachtet werden. Dazu eigneten sich Embryonen am Tag E9-E19, wenn die Front retinotectaler Fasern die Mitte der antero-posterioren Achse des Tectums erreicht hat (s.Abs. 5.).

Der Embryo wurde ca. 30 Stunden nach der RITC-Injektion so gedreht, daß das zum injizierten Auge contralaterale Tectum noch oben lag. Das Tectum wurde von darüberiegenden Membranen und Häuten freipräpariert und in der Kulturschale auf den Objekttisch eines Zeiss-Universal-Fluoreszenzmikroskopes mit festgeschraubtem Objektiv gebracht. Für Übersichtsaufnahmen des Tectums wurden Zeiss-Wasserimmersionsobjektive verwendet (16x, 25x). Für hohe Auflösung wurden das 40x Salzwasser- und das 100x-Öl-Zeiss-Objektiv verwendet. Das Bild wurde mittels einer Restlichtverstärker-TV-Kamera auf einen Monitor projiziert. Es wurde bei Raumtemperatur gearbeitet, um die Bewegung des Embryos herabzusetzen. Die Methode eignet sich wegen der durch die Herzpulsation noch starken Mobilität des Objektes nicht für kinematographische Aufnahmen.

2.6.2. Intrakardiale Perfusion

Eine intrakardiale Perfusion der Embryonen bis zum Embryonaltag E14 war nicht notwendig, da erstens die Blutkörperchen keine bedeutende Hintergrundfluoreszenz zeigen und zweitens die meningealen Membranen über dem Tectum sich leicht mit der Pinzette abziehen lassen, so daß störende epitheliale Gewebsfluoreszenz vermieden werden konnte. Nach E14 lassen sich die Meningen schlecht abziehen. Deshalb wurden die Embryonen mit PBS, pH 7.2) intrakardial perfundiert und dann präpariert (s. unten). Geschlüpfte Küken wurden ebenfalls unter Äthernarkose perfundiert.

2.6.3. Herstellung von tectalen und retinalen Totalpräparaten

Der Embryo wurde decapitiert, in PBS gebracht, und unter dem Stereomikroskop wurden Tecta und Retinae freipräpariert. Das Tectum wurde zusammen mit dem Diencephalon präpariert, über dem sich der zugehörige optische Trakt befindet. Die Retina wurde an vier Stellen (ventral in der optischen Fissur, dorsal, nasal und temporal) aufgeschnitten, von Glaskörper, Linse, Pigmentepithel und orbitalem Gewebe völlig befreit und mit der Ganglienzellschicht nach oben auf einem schwarzen Sartorius-Filter ausgebreitet und festgeheftet (Claviez, 1981; Bonhoeffer und Huf, 1980; Kern-Veits, 1981). Der Filter mit der Retina wurde dann so in einer PBS oder Fixiermittel enthaltenden Petriperm-Schale so gedreht, daß die Retina sich zwischen Schalenboden und Filter befand. In diesem Zustand konnte im Umkehrmikroskop (Zeiss-Axiomat) die Retina beobachtet werden. Alternativ dazu wurde der Filter mit der ausgebreiteten, festgehefteten

Retina auf einen Objektträger gebracht. In diesem Zustand konnte die Retina entweder direkt von oben am Zeiss-Universal-Mikroskop in einem Tropfen Immersionsöl, oder mit einem Deckglas zugedeckt, beobachtet werden.

Das Tectum wurde mit einem Skalpellschnitt in der antero-posterioren Mittelachse in eine ventrale und eine dorsale Hälfte getrennt und mit der Oberfläche auf den Boden einer PBS oder Fixiermittel enthaltenden Petriperm-Schale gebracht. In diesem Zustand konnte das Tectum fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Diese Präparationsmethode wurde bei anterograd Rhodamin-gefärbten Tecta (Abs. 2.1.), bei lokal gefärbten Tecta (Abs. 2.2.) und bei Tecta mit retinalen Transplantaten (Abs. 2.4.) angewandt.

2.6.4. Präparation des optischen Chiasmas in der frühen Embryonalentwicklung

Für detaillierte Untersuchungen der Prozesse, die am Chiasma opticum (an der Basis des Diencephalons) ablaufen, wenn die ersten in Richtung Tectum wachsenden Axone hier ankommen (Abs. 5.), war es notwendig, das Chiasma an den Tagen E3 bis E5 zu isolieren und als Totalpräparat einzubetten. Dazu wurden entsprechend alte anterograd gefärbte Embryonen für etwa 2 Std. in 4 % Paraformaldehyd fixiert, das Paraformaldehyd wurde entfernt (3 Stunden in PBS, pH7,1), die präsumptive Chiasmaregion wurde mit einer feinen Pinzetten unter dem Stereomikroskop freipräpariert und auf Objektträger in einem Glycerintropfen eingebettet und zugedeckt.

2.6.5. Herstellung von Gefrierschnitten und Paraffinschnitten von fixiertem Material

Im allgemein wurden Bodian´s Fixativ (Material) und 4% Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt) gepuffert in PBS, pH7,1) als Fixiertmittel benutzt. Beides eignet eignet sih sowohl für Tectum- als auch für Retinagewebe. Nach der Präparation in PBS wurde das Gewebe in abgekühltes (4°C) Fixiermittel gebracht. Während der Fixierung war die Untersuchung des Materials als Totalpräparat ohne weitere histologische Aufarbeitung möglich. Fixiertes Material (12-24 Std., 4°C) wurde in 70-100%iger Äthanolreihe entwässert, in Paraffin eingebettet und in 10- bis 20um dicke Serienschnitte geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger gebracht, über Nacht an der Luft bei 37°C getrocknet, dreimal je 5min in Xylol (Merck, Darmstadt) entparaffinisiert und in Entellan (Merck, Darmstadt) für die Fluoreszenz-Mikroksopie eingebettet. Material, das aus intratectalen Transplantationsexprimenten stammte, wurde nicht geschnitten, sondern als Totalpräparat ausgewertet. Von repräsentativen Paraformaldehydfixierten Präparaten wurden Gefrierschnitte (10-20µm) hergestellt. Dazu wurde das Paraformaldehyd in 6% Sucrose für 6-8 Std. entfernt. Die Gefrierschnitte wurden bei 37°C über Nacht an der Luft getrocknet und in einem Tropfen Glycerin ohne Deckglas mit Zeiss-Immersionsobjektiven mikroskopisch ausgewertet.

2.7. Meerrettich-Peroxidase(HRP)-Histochemie

2.7.1. Präparation HRP-gefärbten Materials

8 bis 12 Stunden, in einigen Fällen bis 24 Stunden nach der HRP-Injektion wurden die Tecta in PBS präpariert. Das Material wurde drei- bis viermal in PBS gewaschen, um Blutreste zu entfernen, und dann wurde die HRP-Nachweis-Reaktion bei Raumtemperatur ohne Fixierung nach Fujisawa (1981) durchgeführt.

2.7.2. Herstellung des Diaminobenzidin(DAB)-Wasserstoffperoxid(H_2O_2)-Gemisches und HRP-Nachweis-Reaktion

Das Reaktionsgemisch wurde, wie auf Seite 12 beschrieben, in der dort angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert. Dabei wurde das Gemisch auf 60°C aufgewärmt, um p-Cresol aufzulösen. Das Gemisch sollte vor Gebrauch auf Raumtemperatur abkühlen, um Schrumpfung des unfixierten Gewebes zu vermeiden, und sollte kurz vor Gebrauch (ca. 1 Stunde) aus den Stammlösungen zusammengesetzt werden.

Die unfixierten, gewaschenen Tecta wurden im Reaktionsgemisch zwischen 10 und 30 min gelassen, bis eine deutliche bräunliche Färbung des entsprechenden Gewebes auftrat. Das Diaminobenzidin (DAB) wurde durch kurzes Waschen in PBS entfernt und das Material in 4 % Paraformaldehyd, in dem es auch über lange Zeit ohne quantitative oder qualitative Verluste der HRP-positiven Färbung verbleiben konnte, fixiert.

2.8. Mikroskope, Kameras, Videomaterial

2.8.1. Fluoreszenz-Mikroskopie für Rhodamin und Nuclar Yellow

Für Licht- und Fluoreszenz-Mikroskopie wurden folgende Mikroskope verwendet.

1) ZEISS-AXIOMAT, invers. Die Objektive Plan 5x, 10x, 25x, 50x und 100x Öl wurden verwendet. Eine TV-Restlichtverstärkerkamera (SIEMENS oder HAMAMATSU) angeschlossen, die das Bild auf einen Monitor projizierte. Der Projektionsweg ging durch eine Video-Magnet-Anlage (SIEMENS oder NATIONAL), in der die Aufnahmen gespeichert werden konnten. Vom Monitor konnten direkt projizierte Präparate oder Einzelbildaufnahmen photographiert werden. Kamera: Contax, RTS. Filmmaterial: Ilford Pan F (= 50 ASA) oder Agfapan 25 (= 25 ASA).

2) ZEISS-UNIVERSAL-PHOTOMIKROSKOP. Dieses Mikroskop wurde für Aufnahmen von Fluoreszenz-Präparaten und für lichtmikroskopische Aufnahmen verwendet. Häufig wurde anstelle des Photoapparates (Zeiss) eine Restlichtverstärker-TV-Kamera, wie oben beschrieben, benutzt. Objektive 6.3x, Neofluar 16x, 63x Öl, 100x Öl. Filmmaterial für die Zeiss-Kamera: Ilford HP5 (=400 ASA) für Schwarzweiß-Aufnahmen; Kodak-Ektachrome 400, 200 und 160 (Kunstlichtfilm) für Farbaufnahmen.

2.8.2. Mikroskop für HRP-positives Material

ZEISS-Standard-Stereophotomikroskop. Filme: Agfaortho 25 und Ektachrome 160.

III. ERGEBNISSE

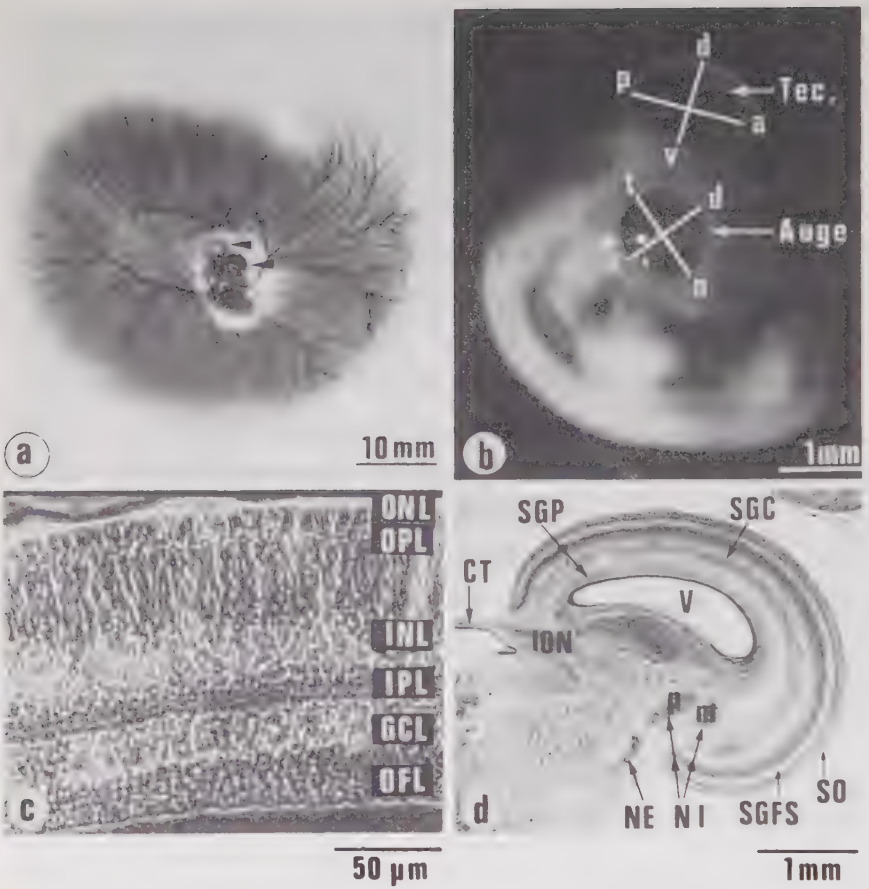
1. Entwicklung der Hühnerembryonen in vitro; Vergleich mit in ovo wachsenden Embryonen

Die Entwicklung der Embryonen und die Ausbeute der beschriebenen Methode ist an anderer Stelle detailliert beschrieben (Auerbach, 1974; De Gennaro et al., 1980; Thanos, 1980).

Das Interesse in dieser Arbeit galt nicht der morphologisch-anatomischen Untersuchung der in vitro wachsenden Embryonen, sondern der Entwicklung der retinotectalen Projektion im Hühnerembryo, die sich zwischen den embryonalen Tagen E3 bis E16 vollzieht (Abschn. 5.). In dieser Entwicklungszeitspanne waren die Embryonen durchaus normal und mit den in ovo wachsenden Embryonen vergleichbar (De Gennaro et al., 1980; Thanos, 1980).

Die Ausbeute überlebender Embryonen nach operativen Eingriffen oder Injektionen war etwas niedriger als die der nicht behandelten Embryonen.

1) Intraocular mit RITC injizierte Embryonen und solche, denen lokal RITC-Kristalle in die Retina oder ins Tectum appliziert wurden, zeigten im Vergleich zu nicht injizierten keine erhöhte Sterblichkeit in den folgenden 2-3 Tagen nach der Applikation des Farbstoffes.
2) Nach operativen Eingriffen im Tectum überlebten alle Embryonen in der Regel die folgenden 12 Stunden, etwa 50% überlebten 2 Tage und einzelne 5 oder 6 Tage.



3) Nach Entfernung des Auges am Tag 3 bis 4 überlebten ca. 50% bis zum Entwicklungstag 6, an dem in einem zweiten Eingriff Retina intratectal implantiert wurde.
Von den so behandelten Embryonen überlebten wiederum etwa 50% die folgenden 24 Stunden, einige überlebten länger. Somit war die Ausbeute an Embryonen in diesem Experiment relativ gering und betrug etwa 10-20% der anfänglich in der Petrischale angesetzten Kulturen.

Abb. 1: In Kulturschale wachsender Hühnerembryo am Embryonaltag E6. Der Embryo selbst ist in der Mitte sichtbar. Es bildet sich unter diesen Bedingungen ein ausgeprägtes Blutgefäßsystem, das die Fläche der verwendeten Petrischale (Ø 10 cm) fast vollständig einnimt. Das rechte Auge und das rechte Tectum opticum des Embryos sind mit Pfeilen gekennzeichnet.
b) Vergrößerte Aufnahme eines Embryos am Tag E4, an dem die verwendete Achsendefinition in der vorliegenden Arbeit gekennzeichnet ist. Die retinalen Fasern verlassen das Auge an der optischen Fissur (kleiner Pfeil im ventralen Auge). a: anterior; d: dorsal; p: posterior; n: nasal; t: temporal; v: ventral.
c) Gefrierschnitt durch eine Retina am Tag E13 im Phasenkontrast. GCL: Ganglienzellschicht; INL: innere nukleäre Schicht; IPL: innere plexiforme Schicht; OFL: optische Faserschicht; ONL: äußere nukleäre Schicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; PE: Pigmentepithel. Die Rezeptorenschicht (zwischen ONL und PE) ist nicht gekennzeichnet.
d) Frontalschnitt durch das Tectum opticum am Tag E13, in dem die Lamination des Tectums sichtbar ist. CT: Commissura tectalis; ION: isthmooptischer Nucleus; NE: Nucleus ectomamillaris; NI: Nucleus isthmi (p: pars parvocellularis; m: pars magnocellularis); SGFS: Stratum griseum et fibrosum superficiale; SGP: Stratum griseum periventriculare; SGC: Stratum griseum centrale; SO: Stratum opticum; V: Ventrikel. Zwischen den bezeichneten grauen Schichten liegen noch weitere Faserschichten, die hier nicht gesondert gekennzeichnet sind.

4) HRP scheint toxische Effekte auf jüngere Embryonen als Tag E9 zu haben. Alle HRP-injizierten Embryonen starben in den folgenden 2-5 Stunden. Embryonen älter als Tag E9 überlebten die HRP-Injektion bis zu 24 Std., bei noch älteren Embryonen schien HRP keinen großen Effekt auf das Überleben zu haben. Der Grund der Toxizität ist nicht klar (Fujisawa, persönliche Mitteilung).

In bezug auf die Entwicklung der retinotectalen Verbindung besteht kein zeitlicher Unterschied zwischen *in ovo* und *in vitro* wachsenden Embryonen. Aus diesem Grunde wird die Entwicklung der Projektion in den *in vitro* Embryonen in der Arbeit als "Normalentwicklung" bezeichnet.

Im Vergleich zu *in ovo* wachsenden bieten die *in vitro* wachsenden Embryonen einige Vorteile hinsichtlich der expe-

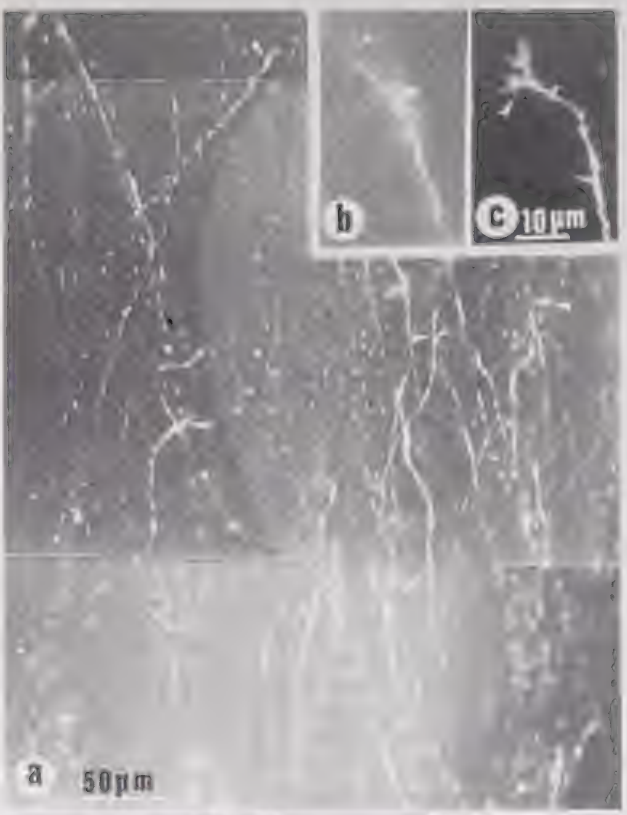
rimentellen Zugänglichkeit bestimmter Organe während der Embryogenese: Injektionen verschiedener Art und lokale Markierung in der Retina und im Tectum sowie chirurgische Eingriffe sind leichter im Kulturembryo durchzuführen. Der Embryo liegt in der Schale meistens mit seiner linken Seite auf dem Schalenboden, so daß das rechte Auge und das rechte Tectum dem Experimentator zugewandt sind (Abb.1a). Aus dieser Lage heraus läßt er sich leicht drehen, so daß auch die linke Seite zugänglich wird.

Wir verwendeten die Achsen für Auge und Tectum, wie auf Abb.1b eingezeichnet. Obwohl das Tectum sich zwischen E6 und E9 um 90° nach lateral dreht und der anteriore Pol lateral wird, behielten wir die Definition der Achsen bei. Somit wird in der gesamten Arbeit die lange Tectumachse als antero-posteriore (AP-Achse) und die kurze Tectumachse als dorso-ventrale (DV-Achse) definiert. Im Auge wird die durch die optische Fissur (Abb.1b) gehende Achse als DV-Achse und die senkrecht dazu stehende als naso-temporale Achse definiert (Crossland et al., 1975; Rogers, 1960; Goldberg, 1972). In den Abb. 1c und 1d sind Schnitte durch die Retina und durch das Tectum am Embryonaltag E13 dargestellt. Die Retina ist in diesem Alter laminiert (Abb.1c). Die Zellen, die Axone zum Tectum aussenden, befinden sich in der Ganglienzellschicht (GCL). Diese Axone bilden die optische Faserschicht (OFL). In der Abb.1d ist die Lamination des Tectums in einem frontalen Schnitt auf der Höhe der Commissura tectalis (CT) dargestellt. Die aus der GCL der Retina stammenden Axone bilden auf dem Tectum das Stratum opticum (SO) und tauchen jeweils über ihrem Projektionsgebiet in die

tieferen Tectumschichten ein (Stratum griseum et fibrosum superficiale, SGFS), um dort mit tectalen Zellen synaptische Kontakte herzustellen. Es wurde für Retina und Tectum jeweils die Nomenklatur nach Cajal (1908) und Cowan et al. (1961) verwendet.

2. Bidirektionale Markierung des wachsenden retinotectalen Systems mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Rhodamin (RITC)

Der Farbstoff RITC wird seit längerer Zeit routinemäßig in der Immunologie zur Markierung von Antikörpern verwendet. In der Neurobiologie wurde der Farbstoff zunächst für Aggregationsstudien von embryonalen Retinazellkulturen *in vitro* (Bonhoeffer und Huf, 1980) verwendet. Weiterhin wurde der Farbstoff zur Markierung von retinalen Explantaten *in vitro* herangezogen. Bei diesen Untersuchungen beobachtete man, daß auswachsende Neuriten aus Retina-Explantaten bis in ihren Wachstumskegel mit Rhodamin gefüllt waren (Bonhoeffer und Huf, 1980, 1982), d.h. der Farbstoff wird in den wachsende Fasern im Faserzylinder in Richtung des Wachstumskegels hineintransportiert. Diese Beobachtung führte zu der Überlegung, daß man ähnlichen axonalen Transport des Farbstoffes in den *in vivo* wachsenden retinalen Axonen erreichen könnte. Da der Farbstoff in Wasser unlöslich ist, wurde er entweder als eine Dimethyl-Sulfoxid(DMSO)-Lösung für Färbung des ganzen retinotectalen Systems *in vivo* verwendet oder ungelöst in seiner kristallinen Form appliziert, um auf der einen Seite bestimmte retinale Regionen lokal für anterograden Transport


a
50µm
b
c
10µm

d

Pm
0,1mm
SO
SGF5
e

Abb. 2: Anterograde Rhodaminfärbung des retinotectalen Systems.
a) Aufsicht auf ein tectales Totalpräparat am Tag E10 zeigt mehrere fluoreszierende Fasern, die bis zu ihrem Wachstumskegel (Pfeile) mit dem Farbstoff gefüllt sind.
b) und c) Zwei vergrößerte Wachstumskegel am Tag E10, bei denen der Farbstoff bis in die feinen Filopodien (Pfeile) hineintransportiert wurde.
d) Gefrierschnitt durch das anterograd gefärbte Tectum, in dem fluoreszierende retinale Fasern im Stratum opticum (SO) und eintauchende Fasern in tectale Schichten (SGFS, mit Pfeilen gekennzeichnet) dargestellt sind.
e) Paraffinschnitt durch ein anterograd gefärbtes Tectum am postnatalen Tag 7 zeigt das stark fluoreszierende Stratum opticum und ins SGFS eintauchende Fasern (Pfeile). pm: Piamembran. Die Bezeichnung der Schichten von e) gilt auch für d).

und auf der anderen Seite das Tectum lokal für retrograden Transport zu markieren. Als anterograd wird die Richtung vom Zellkörper zur Axonspitze hin, als retrograd die entgegengesetzte Richtung definiert. Es ist nicht bekannt, in welcher Form Rhodamin transportiert wird. Aus in vitro-Zeitrafferaufnahmen von gefärbten Neuriten ist bekannt, daß gefärbte Vesikel vom Zellkörper zum Wachstumskegel hinwandern (Bonhoeffer, persönliche Mitteilung). In vivo gefärbte Axone (Abb.2a) und Zellkörper (Abb.4b) zeigen ähnliche Vesikel. Es ist nicht bekannt, in welchem Umfang diese Vesikel zum Gesamttransport von Rhodamin beitragen.

2.1. Anterograder Rhodamin-Transport nach intravitrealer Injektion

DMSO-gelöstes RITC diffundiert im Glaskörper nach intraocularer Injektion und färbt die gesamte Retina gleichmäßig an. Mit einer Transportgeschwindigkeit von etwa 10mm/Tag wandert Rhodamin in die Axone und taucht in den Wachstumskegel auf dem Tectum etwa 24 Stunden und auf dem posterioren tectum etwa 36 Stunden nach der Injektion auf.

In jüngeren Embryonen, bei denen die retinotectalen Axone noch nicht das Tectum erreicht haben (E3 bis E5) braucht der Transport bis zum Wachstumskegel etwa 10 Stunden am Tag E3 und 18 Stunden am Tag E5.

Der anterograde axonale Transport von Rhodamin ist somit nach der Klassifikation von Grafstein und Forman (1980) ein schneller axonaler Transport. Im Vergleich zu anderen bekannten anterograd transportierbaren Substanzen wird Rhodamin gegenüber Aminosäuren (Crossland et al., 1975) und HRP (LaVail u.LaVail, 1974) langsamer transportiert. Außerdem wird es langsamer transportiert gegenüber anderen anterograd transportierbaren intracellulär injizierbaren Fluoreszenzmarkern, wie Lucifer Yellow (Stewart, 1981) und Procion Yellow (Stretton und Kravitz, 1968).

Sind retinotectale Fasern nach der Rhodaminfärbung noch wachstumsfähig? In vitro-Zeitraffer-Aufnahmen (Bonhoeffer, persönliche Mitteilung) zeigen, daß angefärbte Fasern noch weiterwachsen. Ihre Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber nicht angefärbten Neuriten ist nicht vermindert. In vivo angefärbte Fasern an den Embryonaltagen E3 bis E5 (Axone haben das Tectum noch nicht erreicht) tauchen am Tag E6 auf dem Tectum auf. Dies ist ein Hinweis dafür, daß auch in vivo die Wachstumsfähigkeit nicht beeinträchtigt ist. Ein weiterer Hinweis dafür, daß die Rhodamin-Injektion das Faserwachstum nicht beeinflußt, ist die Tatsache, daß der Zeitverlauf der Enwicklung der retinotectalen Projektion nicht beeinflußt ist. Die genannten Hinweise sprechen für eine Nichttoxizität des Farbstoffes und des DMSO (in der benutzten Konzentration) für retinotectale Axone.

Wird Rhodamin von den Axonen, in denen es transportiert wurde, an die extrazelluläre Umgebung oder an andere zelluläre Strukturen weitergegeben? Um diese Frage zu beantworten, war es notwendig, Embryonen nach der Rhodamin-Injektion über längere Zeit zu kultivieren und zu bestimmen, in welchen Strukturen des Tectums die Farbe noch auffindbar ist. Dazu wurden drei Embryonen am Tag E7 in das rechte Auge mit 4ul RITC-Lösung injiziert. Am E12 wurde das kontralaterale Tectum freipräpariert, fixiert, un es wurden Gefrierschnitte hergestellt. Bei allen drei Embryonen fand sich die Farbe ausschließlich im Stratum opticum des Tectums, das von den retinotectalen Fasern gebildet wird, wieder. Dieses Ergebnis zeigt daß die transportierte Farbe mindestens 5 Tage in den retinotectalen Axonen bleibt und nicht oder nur sehr unwesentlich herausdiffundiert. Ähnliche Versuche mit HRP (LaVail et al., 1974) zeigten, daß HRP nach etwa 24 bis 48 Std. aus den Zellen, in denen es transportiert war, herausdiffundierte. Der Farbstoff Lucifer Yellow, der ebenfalls anterograd transportiert wird, wenn er intrazellulär Motoneuronen von Invertebraten injiziert wird, diffundiert aus den gefärbten Axonen heraus (Paul Whitington, persönliche Mitteilung).

Anterograde Rhodamin-Markierung bietet gegenüber anderen anterograd transportierbaren Fluoreszenz-Farbstoffen (Lucifer Yellow und Procion Yellow) einige Vorteile, die an anderer Stelle diskutiert werden.

Rhodamin eignet sich als anterograder Marker nicht nur im embryonalen, sondern auch im fertigen, adulten retinotectalen System des Huhns. Um das zu zeigen, wurden zwei eine

Woche alte Hühnchen unter Äthernarkose mit jeweils 8ul gelöstem RITC in das rechte Auge injiziert. Zwei Tage später wurden die Tiere unter Äthernarkose intrakardial mit PBS, pH 7.2, perfundiert, ihre Tecta wurden fixiert und in Paraffin geschnitten. Abb.2e zeigt einen solchen Schnitt, in dem das Stratum opticum und Fasern, die in tieferliegende tectale Schichten einwachsen, gefärbt sind.

2.2. Anterograder Rhodamin-Transport nach lokaler RITC-Applikation in der Retina

Die Unlöslichkeit des RITC wurde genutzt, um lokale Markierung von bestimmten retinalen Bereichen zu erreichen. Die unter Meth. 2.2.2. beschriebenen RITC-Kristalle lösen sich in der Retina nicht auf und sind nach mehrtägiger Inkubation des Embryos als solche noch auffindbar. Voraussetzung für lokale Markierung ist eine möglichst geringe Verletzung der Basalmembran (Membrana limitans interna), die sich zwischen Retina und Glaskörper befindet. In Totalpräparaten (Abb.3) fluoresziert die Umgebung der RITC-Applikation sehr stark. Die Intensität nimmt ab mit zunehmendem Abstand vom Kristall. In Paraffin-Schnitten durch diese Region sind in der Nähe des Kristalls alle retinalen Zell- und Faserschichten gefärbt. Etwas weiter entfernt davon (0,5 mm) sind hauptsächlich Zellen in der Ganglienzellschicht (GCL) und in der inneren Zellschicht (ICL) gefärbt (Thanos and Bonhoeffer, 1983).

Abb. 3: Lokale anterograde Markierung des retinotektalen Systems in zwei verschiedenen Embryonalstadien. a) zeigt eine ausgebreitete Retina als Totalpräparat am Tag E5 nach RITC-Applikation dorsal 12 Stunden zuvor. Man erkennt bei kleiner Vergrößerung, daß die aus der gefärbten Region (RITC) ausgehenden Fasern (Pfeile) mit Rhodamin gefüllt sind. Sie konzentrieren sich in der optischen Fissur (OF), wo sie die Retina verlassen, um als optischer Nerv ins Tectum zu gelangen. Eingezeichnet ist die dorso-ventrale und naso-temporale Orientierung der Retina. b) zwei herausvergrößerte Wachstumskegel mit vielen apikal gerichteten Filopodien. c) Lokale Markierung in der dorsalen peripheren Retina am Tag E11. Man findet zu diesem Entwicklungszeitpunkt keine Wachstumskegel mehr in der Retina. In diesem Bild sind etwa 200 Axone markiert (weißer Pfeil). RITC: periphere Position des Farbstoffes. OF: optische Fissur.

Kurz vor dem Ausgang der retinalen Axone aus der Retina ist nur noch die optische Faserschicht (OFL) gefärbt (Thanos and Bonhoeffer, 1983). Lokal gefärbte Axone können über die Retina hinaus im optischen Nerven im optischen Trakt und auf dem Tectum bis hin zu ihren Projektionsgebieten verfolgt werden. Wir benutzten diese Färbung, um die retinotope Organisation des visuellen Systems während der Entwicklung zu studieren (Abschn. 5.).

Mit dieser Methode läßt es sich erreichen, daß etwa nur 100 bis 300 Fasern gefärbt werden. In Abb.3b sind etwa 200 Fasern markiert. Die Farbstoffeigenschaften sind im vorigen Abschnitt beschrieben und gelten auch für die lokale anterograde Rhodaminfärbung.

2.3. Retrograder Rhodamin-Transport vom Tectum in die Retina

In seiner DMSO-gelösten Form konnte RITC nicht in das Tectum injiziert werden, weil die Farbe sich im Ventrikel ansammelt und die retinotectalen Fasern, die an der äußeren Wandseite entlangwachsen, die Farbe nicht aufnehmen können. Deshalb wurde RITC in seiner ungelösten Form auf die Tectumoberfläche appliziert (Meth. 2.2.2.). Die retrograde Transportgeschwindigkeit des Farbstoffes beträgt etwa 5mm/Tag, ist also halb so hoch wie die Geschwindigkeit des anterograden Transports. In welcher Form der Farbstoff aufgenommen und transportiert wird, ist unbekannt. Man findet

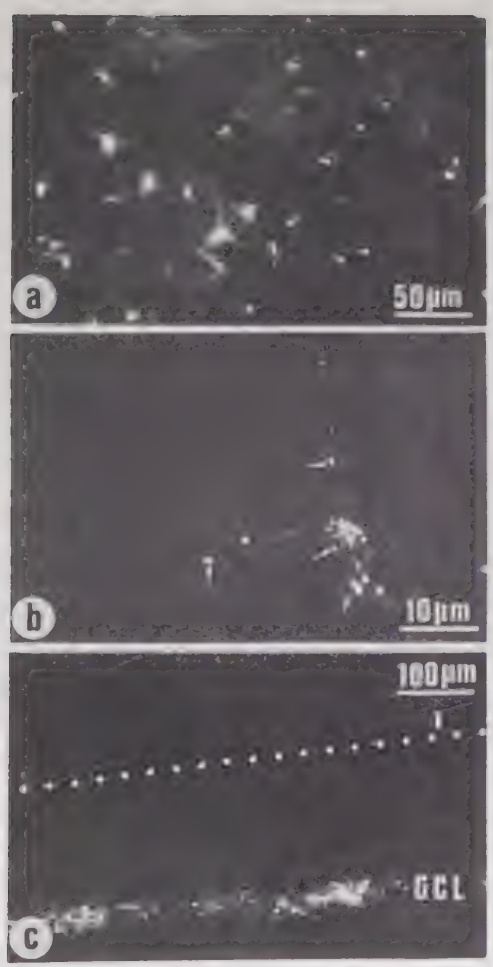


Abb. 4: Retrograde Rhodamin-Markierung des retinotectalen Systems. a) Übersichts-Fluoreszenzaufnahme der kontralateralen Retina nach RITC-Applikation im Tectum am E9. Mehrere fluoreszierende Ganglienzellen sind sichtbar. b) eine mit der Restlichtverstärkungskamera vergrößerte Ganglienzelle zeigt die Rhodamin-gefüllten Granulae im Zellkörpr und in den Fortsätzen (Pfeile). c) Gefrierschnitt durch eine retrograd gefärbte Retina am Tag E11 bei kleiner Vergrößerung zeigt die Verteilung der gefärbten Zellen in der Ganglienzellschicht (GCL). Die punktierte Linie zeigt die nur im Phasenkontrast sichtbare äußere Grenze der Retina.

ihn in den retinalen Ganglienzellen in cytoplasmatische Granula eingeschlossen (Abb.4b). Der Zelllkern der Ganglienzellen ist nicht gefärbt. Es stellte sich die Frage, ob der Farbstoff von verletzten Axonen oder von gesunden Axonen aufgenommen wird, denn aus der experimentellen Prozedur der RITC-Applikation, bei der die Piamembran durchgeschnitten wird, geht hervor, daß möglicherweise darunterliegende Axone verletzt werden, die zur Farbstoffaufnahme an der Verletzungsstelle befähigt werden. Um diese Frage zu klären, wurde folgender Versuch durchgeführt. Am Tag E8 wurde bei 4 Embryonen RITC in das posteriore Tectum appliziert, das von retinalen Axonen noch nicht erreicht ist (Abschn. 5.). Die Embryonen wurden bis zum Tag E12 weiterinkubiert (zwischen Tag E10 und E11 erreichten die wachsenden Fasern die RITC-Applikationsstelle). Bei allen vier Embryonen wurden retrograd gefärbte Zellen in der contralateralen Retina (nasal) gefunden. Dieser Versuch zeigt, daß Verletzung der Axone nicht notwendig ist um die Axone zur Farbstoffaufnahme zu befähigen, schließt aber nicht aus, daß die Aufnahme durch die Axone nur am Wachstumskegel stattfindet. Andererseits konnte durch RITC-Applikation auf das anteriore Tectum älterer Embryonen, das keine Wachstumskegel mehr enthält, gezeigt werden, daß Axonzylinder RITC aufnehmen (unveröffentlichte Ergebnisse). Hierbei bleibt ungeklärt, ob die Farbstoffaufnahme auf einer geringfügigen Verletzung beruht. Die retrograde Rhodaminmarkierung des retinotectalen Systems wurde angewandt, um Fragen anzugehen, die unter Abschn. 8.1. und 8.2. behandelt werden.

2.4. Auswachsende, mit Rhodamin gefärbte Neuriten aus intratectal implantierten Retinatransplantaten

Aus Rhodamin-gefärbten, intratectal implantierten Retinatransplantaten und aus einzelnen Zellen, die als gefärbte Zellsuspension ins Tectum injiziert wurden, wachsen Neuriten aus, die bis in ihre Wachstumskegel gefärbt sind. Solche Neuriten gleichen den *in vivo* anterograd gefärbten Axonen. Aus einer Zelle wachsen meistens mehrere Fortsätze, wie in Einzelzellinjektionen auf dem Tectum zu sehen ist (Abb.21c). Die Farbe diffundiert für mindestens 4-5 Tage nicht aus den Neuriten oder aus dem Transplantat heraus. In vielen Fällen läßt sich an Hand der Morphologie nicht entscheiden, welche Neuriten Axone sind. Es war nur dann eindeutig zu entscheiden, wenn wachsende Neuriten besonders lang und unverzweigt waren. Die Richtung, Länge und Zahl solcher auswachsenden Fasern wurden aus einer Reihe von Transplantaten ausgewertet, um Aufschlüsse über spezifisches Ausrichten der auswachsenden Neuriten zu gewinnen (Abschn. 7.).

3. Retrograde Markierung des retinotectalen Systems mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Nuclear Yellow (Hoechst 5769121

Bestimmte Fragestellungen hinsichtlich der Entwicklung der retinotectalen Projektion lassen sich mit Doppelmarkierungen angehen. Als Beispiel wird an dieser Stelle die Frage geprüft, ob während ihres Wachstums retinotectale Fasern Kollaterale zum "falschen", ipsilateralen Tectum entsenden

oder nicht. Wenn ja, sollte eine Ganglienzelle in der Retina, deren Axon Kollaterale bildet, von beiden Tecta aus retrograd anfärbbar sein. Als zweiter Marker neben Rhodamin wurde hier der bekannte Farbstoff Nuclear Yellow (Hoechst 5769121) (Bentivoglio et al., 1980) verwendet. Nuclear Yellow ist in Wasser schwerlöslich und eignet sich deshalb, um in kristalliner Form (wie das RITC) ins Tectum appliziert zu werden. Dieser Farbstoff fluoresziert gelb (520 nm) und kann somit von der roten Rhodamin-Fluoreszenz ($\geq$590 nm) unterschieden werden. Er wird mit einer Transportgeschwindigkeit von 5-10mm/Tag retrograd transportiert und im Zellkörper der Ganglienzellen akkumuliert (Abb. 25b). Er färbt keine Fortsätze der Ganglienzellen innerhalb der Retina. Ob er von den Zellen an andere Strukturen weitergegeben wird, ist bis jetzt noch nicht getestet worden.

4. Anterograder Meerrettich-Peroxidase(HRP)-Transport im retinotectalen System des Hühner-Embryos

Es ist seit längerer Zeit bekannt,daß im retinotectalen System des Huhns das Enzym Meerretch-Peroxidase intraaxonal in retrograder Rictung transportiert wird (LaVail et.al. 1974; Clarke et.al. 1978) Das Enzym wird ebenfalls in anterograder Richtung transportiert (Clarke et al.1978;McLoon et.al.1982).In den erwähnten Arbeiten wurden nach dem HRP-Transport die entspechenden Gewebe fixiert und für die Enzym-Nachweis-Reaktion geschnitten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine von Fujisawa(1981) für das retinotectale System der Amphibien entwickelte HRP-Technik verwendet. Als Nachweis-Reagens wurde Diaminobenzidin (DAB) eingesetzt.

Nach intraocularer Injektion von 20-30% HRP-Lösung wird das Enzym von unverletzten Ganglienzellen der Retina aus dem vitrealen Raum aufgenommen und mit einer Geschwindigkeit von etwa 30-40mm/Tag anterograd zum Tectum transportiert.

Die Tecta der injizierten Embryonen wurden 8-12 Std. später präpariert. Die HRP-Nachweis-Reaktion wurde an unfixierten, ungeschnittenen Tecta durchgeführt (Abb.5). Gegenüber den bekannten Methoden hat diese Technik den Vorteil, daß Übersichtsbeobachtungen der räumlichen Strukturen im Gehirn ermöglicht werden. Sie hat den Nachteil, daß die Penetrationsfähigkeit sehr gering ist, so daß im Gehirn tiefer liegende HRP-gefüllte Strukturen nicht erfaßt werden können. HRP-Markierung wurde eingesetzt, um

a) die Normalentwicklung der retinotectalen Projektion übersichtlich zu verfolgen,
b) die Entwicklung und den Verlauf einer abnormalen ipsilateralen Projektion bei monocularen Embryonen zu studieren (Abschn. 8.2.) und
c) übersichtlich den Verlauf abgelenkter retinotectaler Fasern auf dem Tectum zu verfolgen (Abschn. 6.).

Dem Rhodamin gegenüber bietet HRP den Vorteil, bei kleinen Vergrößerungen (Stereomikroskop) Übersicht zu gewährleisten, und den Nachteil, daß die Auflösung nicht bis in den Einzelfaserbereich, sondern nur bis in den Faszikelbereich reicht.

Zusammenfassend läßt sich über den methodischen Teil der Arbeit sagen, daß hier drei verschiedene anterograd und

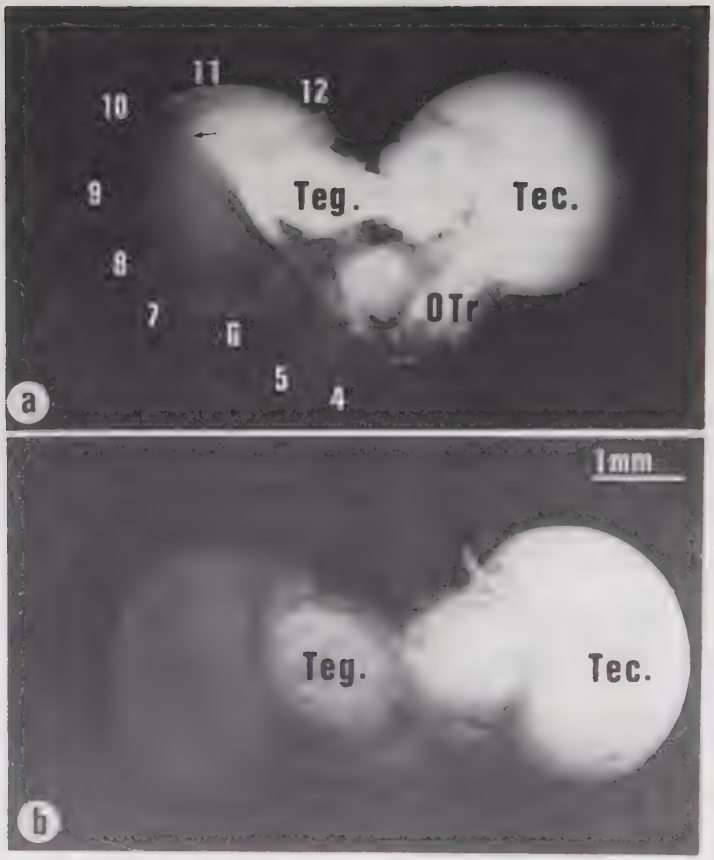


Abb. 5: Anterograde Markierung des retinotectalen Systems mit Meerrettich-Peroxidase am Tag E11 (a) und E13 (b). Am Tag E11 erreicht die in die Pfeilrichtung wachsende Faserfront etwa 3/4 der Länge der antero-posterioren Achse und am Tag E12 den posterioren Tectumpol. Die Zahlen neben dem Tectum auf a) zeigen den Zeitverlauf der wachsenden Faserfront zwischen E4 und E12 (s. Textseite). Einzelne Axone sind bei dieser Vergrößerung nicht sichtbar, man erkennt Faserbündel (kleiner Pfeil auf a). OTr: Optischer Trakt; Tec: Tectum; Teg: Tegmentum.

retrograd transportierbare Marker (Rhodamin, HRP, Nuclear Yellow) verwendet wurden, um bestimmte Aspekte der Entwicklung der retinotectalen Projektion beim Huhn anzugehen. In den folgenden Abschnitten werden solche Aspekte einzeln behandelt.

5. Die Normalentwicklung der retinotectalen Projektion beim Hühnerembryo

5.1. Entwicklung der kontralateralen Projektion

Im Hühner-Embryo (Brutzeit 20-21 Tage) vollzieht sich die Verbindung zwischen Retina und Tectum zwischen den Embryonaltagen E2.5, wenn die ersten Ganglienzellaxone in der zentralen Retina auswachsen (Goldberg, 1972; Kahn et al., 1975), und E15, wenn neben der Synaptogenese als Hauptvorgang im Tectum modulatorische Vorgänge, wie Elimination falscher Projektionen (McLoon et al., 1982; Clarke et al., 1978) und Zelltod in der Retina (Rager, 1980; Kahn, 1975) sich vollzogen haben.

Aus früheren Untersuchungen mit unterschiedlichen Methoden sind folgende Daten über die frühe Entwicklung der retinotectalen Projektion an den Tagen E2 und E3 bekannt:

a) die ersten Ganglienzellen werden am Tag E2 in der zentralen Retina postmitotisch und senden Axone aus in Richtung der optischen Fissur, die die Verbindung zwischen Retina und optischem Nerven darstellt (Goldberg, 1972; Rager, 1980). Von dieser "zentralen" Stelle breitet sich die Ganglienzellreifung fast konzentrisch aus; die Produktion neuer Zellaxone folgt dieser Ganglienzellreifung in einem

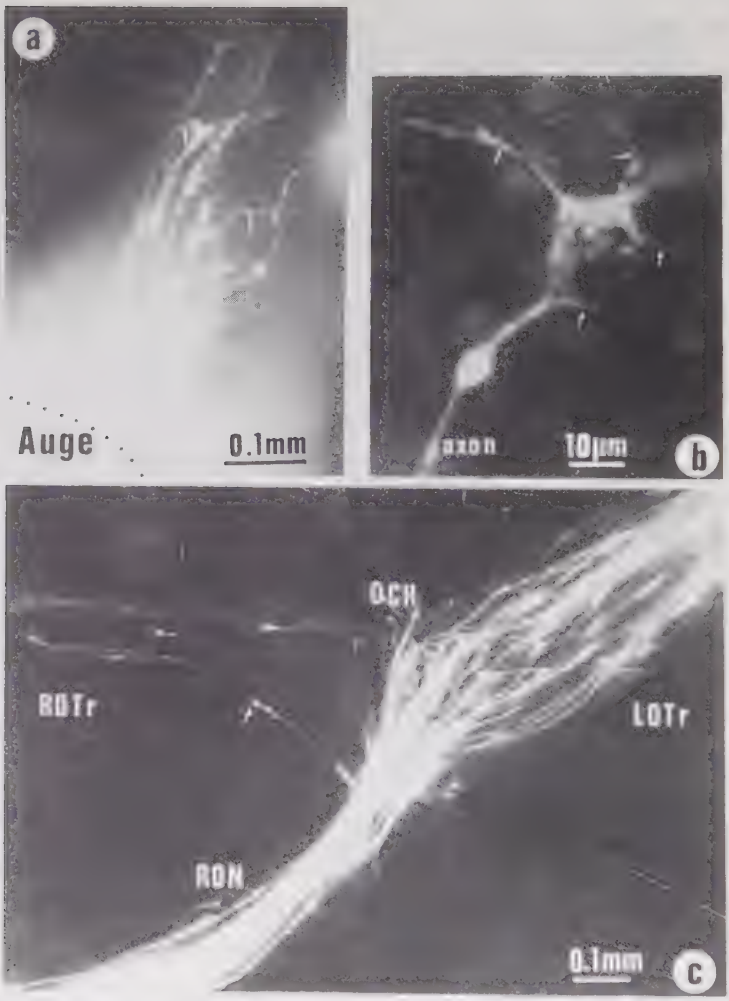

a
Auge
0.1mm
axon
10µm
b
OCH
ROTr
LOTr
RON
0.1mm
c

Abb. 6: Frühe Entwicklung der retinotectalen Projektion (E3-E4). a) Fluoreszierende Axone innerhalb des optischen Nerven am frühen Tag E3. Links unten das injizierte Auge; die Grenzen des Neuroepithels im Nerven sind nicht sichtbar. Man erkennt, daß, obwohl eine gewisse Parallelität der Axone existiert, einige Axone die allgemeine Richtung kreuzen und nicht geradeaus wachsen (Pfeile). b) Ein vergrößerter Wachstumskegel innerhalb des optischen Nerven am Tag E3. c) Am frühen E4 erreichen 50-100 Axone die Region, wo später das Chiasma opticum (OCH) entsteht. Die meisten Axone wachsen geradeaus und kreuzen zur kontralateralen Seite hin, einige bleiben auf der ipsilateralen Seite. Die entsprechenden Axone aus dem anderen Auge sind nicht gefärbt, deshalb unsichtbar. Der Pfeil in ROTr zeigt einen ipsilateral wachsenden Wachstumskegel. LOTr: Linker optischer Trakt; ROTr: rechter optischer Trakt, RON: rechter optischer Nerv.

zentral-peripheren Gradienten (Kahn, 1975; Rager, 1980). Dabei wachsen die Axone mit 99%iger Wahrscheinlichkeit in Richtung der optischen Fissur aus (Jacobson, 1978). Wodurch diese Richtungspräferenz des Auswachsens der Axone bedingt ist, ist nicht genau bekannt; Jacobson (1978) nennt die Polarität der Anordnung der Ganglienzellen als ausschlaggebenden "Führungs"-Faktor.

b) Die ersten Ganglienzellaxone erreichen am Tag E3 den ventralen "Boden" des an der Fissur beginnenden optischen Nerven (Rager, 1980), der bis zu diesem Entwicklungszeitpunkt eine tubuläre neuroepitheliale Verbindung zwischen Auge und Diencephalon darstellt. In der vorliegende Arbeit wurde von diesem Zeitpunkt an das Wachstum der in Richtung Tectum wachsenden Axone mit Hilfe von Rhodamin-Färbung untersucht (Abb.6). mit Rhodamin angefärbt.

Das Bild dieses Zeitverlaufes sieht so aus: Am Tag E6 erreicht die Faserfront den ventro-anterioren (rostralen) Tectumpol (Abb. 7a und 5a). Die einwachsenden Fasern tauchen nicht in tectale Schichten ein, um Verbindungen einzugehen,

sondern bleiben als einschichtiges Stratum opticum auf der Tectumoberfläche und wachsen weiter bis zum Tag E8 (Rager, 1979). Zu diesem Zeitpunkt tauchen erste retinale Axone in die Tectumschichten ein (Rager, 1979). Nach den Untersuchungen anderer Gruppen (Crossland et al., 1975; Cowan et al., 1961) findet dieser Prozess des Eintauchens ins Tectum am Tag E10 statt. Mit dem Fortschreiten der Faserfront nach dorso-posterior (caudal) an den folgenden Tagen wächst das Stratum opticum durch das Hinzukommen von neuen retinalen Fasern und erreicht am Tag E12 eine Dicke von etwa 0,1mm am anterioren Tectumpol. Am Tag E12 erreicht die wachsende Front das posteriore Tectum (Abb.5a und Goldberg, 1974).

Parallel zum Einwachsen und zum Fortschreiten der retinalen Faserfront auf dem Tectum sowie zum Eintauchen von retinalen Fasern ins Tectum finden in der Retina und innerhalb der visuellen Bahn zwischen Auge und Tectum wichtige Vorgänge statt, die direkt mit der Entwicklung der Retinotopie der retinotectalen Projektion zusammenhängen:

a) In der Retina bilden sich zirkumferentiell neue Ganglienzellen, die ihre Axone in Richtung der optischen Fissur aussenden. Diesem Vorgang parallel verläuft der Prozeß der Lamination der Retina (Kahn, 1975) in abwechselnde Zell- und Faserschichten (Abb. 1c). Am Tag E9 beginnt in der Retina ein Zelltod von Ganglienzellen, der sich an den folgenden Tagen (bis E14-E15) fortsetzt (Rager, 1976). Bemerkenswert ist, daß dieser Zelltod in der Retina zum ungefähren Zeitpunkt des Eintauchens retinaler Axone ins Tectum beginnt und dann endet, wenn sich die retinotectale Verbindung in ihrem adulten Muster etabliert hat (Rager,

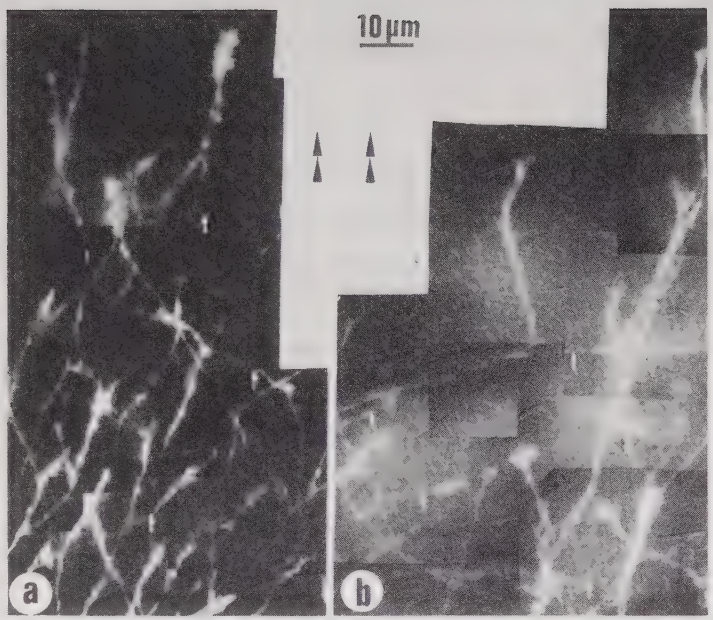


Abb. 7: Die Faserfront auf dem kontralateralen Tectum am Tag E6 (a) und E10 (b). a) Am Tag E6 auf dem anterioren Tectumpol ist das Stratum opticum sehr dünn. Die meisten Axone wachsen von anterior nach posterior (Pfeilrichtung für beide Bilder). Einige Axone (Pfeile) kreuzen diese Richtung nach dorsal oder nach ventral. b) Am Tag E10 auf dem posterioren Tectum (2/3 der AP-Achse). Mehrere Fasern kreuzen in dorsoventrale Richtungen (Pfeile). Bei beiden Bildern sind einzelne Wachstumskegel mit Filopodien sichtbar.

1976, 1979). Wegen dieser zeitlichen Parallelität wird der Zelltod in der Retina direkt in Verbindung mit Synaptogenese-Prozessen im Tectum gebracht (Jacobson, 1978; Cowan, 1978; Rager, 1976, 1980). Zelltod führt zu einer "Schärfung" der Projektion, indem er durch Abbau von in das "falsche" Gebiet gewachsenen und von "falsch" verbundenen Axonen zugunsten topographisch richtig hergestellter Verbindungen führt.

b) Im optischen Nerven und im optischen Trakt vermindert sich die Anzahl der Fasern von etwa 4.5 auf etwa 2.5 Millionen während der Zeit des Zelltodes in der Retina (Rager, 1976).

Da die oben beschriebenen Vorgänge schon bekannt sind, wurden sie mit den Rhodamin-Färbemethoden nicht weiter untersucht. Im Vordergrund dieser Arbeit standen in bezug auf die kontralaterale Projektion die Fragen:

- Sind der optische Nerv, der optische Trakt und das Stratum opticum während der Entwicklung retinotop organisiert und wenn ja, welche Organisationsprinzipien liegen bei dieser Retinotopie vor?
- Gibt es "Faser-Faser"-Beziehungen innerhalb der wachsenden retinotectalen Projektion und wenn ja, wie kann man solche Beziehungen erfassen und interpretieren?
- Wie reagieren wachsende Fasern auf dem Tectum, wenn sie z.B. durch mechanische Hindernisse aus ihrer "normalen" Bahn" abgelenkt werden?

5.1.1. Retinotopie der kontralateralen retinotectalen Projektion im optischen Nerven und im optischen Trakt

Die im adulten visuellen System vorhandene doppelspiegelbildliche Projektion der Retina auf das Tectum (DeLong et al., 1965; Crossland et al., 1975, 1979; Clarke et al., 1976; Cowan et al., 1961) impliziert, daß die beiden retinalen Achsen (DV- und AT-Achse) sich während der Entwicklung so umkehren, daß einerseits die dorsale Retinahälfte ventral und die ventrale Retinahälfte dorsal und andererseits die

nasale Retinahälfte posterior (caudal) und die temporale Retinahälfte anterior (rostral) auf das Tectum projiziert werden. Das Einwachsen aller retinalen Fasern auf das Tectum verläuft in einer antero-posterioren Richtung (entspricht der retinalen temporo-nasalen Achse). Fasern und Faserfaszikel sind fast parallel zueinander. Diese Parallelität impliziert, daß vor der Ankunft der Fasern am Tectum eine topographische Vorordnung der Fasern existiert und daß demnach die Achseninversion vor dem Tectum erfolgt sein muß. Die Tatsache aber, daß auch im optischen Trakt und im Chiasma diese dorsoventrale Parallelität vorkommt, verschiebt den Ort der dorsoventralen Inversion weiter retinawärts, also in den optischen Nerven. Diese Beobachtungen des Gesamtmusters wurden hier experimentell bestätigt. Die Methode der Wahl war in diesem Fall die lokale Rhodamin-Markierung einzelner retinaler Felder während der Entwicklung. Am Tag E10 wurde bei 5 Embryonen RITC lokal auf die dorsale und bei 5 Embryonen lokal auf die ventrale Retina appliziert.

Am Tag E12 wurden die Embryonen dekapitiert und fixiert. Es wurden Schnitte an verschiedenen Stellen entlang der gesamten visuellen Bahn zwischen Retina und Tectum hergestellt, an denen der Verlauf der lokal markierten Fasern sichtbar werden konnte.

Die Fasern aus der dorsalen Retinahälfte erreichen den Anfang des optischen Nerven an seinem dorsalen Rand. Im Verlauf des Nerven kreuzen sie allmählich nach ventro-lateral. Kurz vor dem Eintritt in das Chiasma befinden sie sich

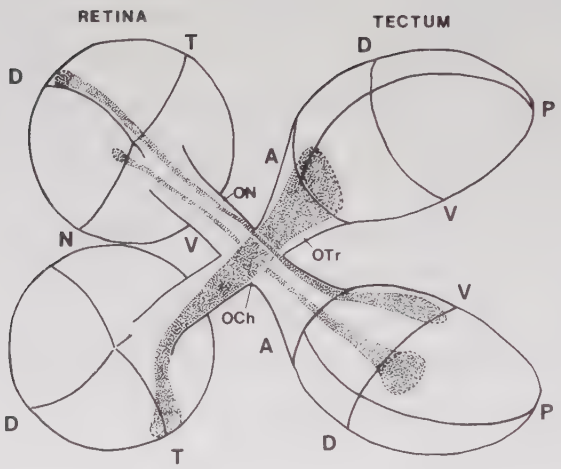


Abb. 8: Camera lucida-Zeichnung eines Totalpräparates des retinotectalen Systems am E12, an dem die Achsen für die Retina und für das Tectum eingezeichnet sind. Aus Schnitten durch die visuelle Bahn nach lokaler RITC-Markierung der Retina und aus Totalpräparaten wurde der "Weg" der Fasern aus bestimmten Retinaregionen rekonstruiert. Hier sind drei Beispiele für dorsale-periphere (1) und zentrale (2) Fasern und für temporale periphere (3) Fasern punktierte Bahnen eingezeichnet. Die durch gestrichelte Linie markierte Fläche auf dem Tectum entspricht dem Projektionsgebiet der jeweiligen retinalen Fasern. In den Abb.9 und 10 sind Original-Mikrophotographien von Schnitten durch die optische Bahn dargestellt. OCh: optisches Chiasma; ON: optischer Nerv; OTr: optischer Trakt.

auf der ventralen Seite des Nerven, und in dieser Stellung gehen sie durch das Chiasma, in dem sie die vertikalen latero-ventralen Chiasma-Laminae bilden.

Die Fasern aus der ventralen Retinahälfte verlaufen umgekehrt zu den dorsalen. Sie wachsen ventral in den Nerven ein und passieren das Chiasma durch die medio-dorsalen Lami-

nae, nachdem sie allmählich im optischen Nerven die mehr mediale Hälfte einnehmen. Die Ergebnisse über den Verlauf der Fasern bei drei repräsentativen Lokalmarkierungen sind auf der Abb. 8 in einer Zeichnung über das ganze visuelle System hinweg eingezeichnet. Die Zeichnung wurde hergestellt aus Auswertungen von Totalpräparaten und von Schnitten entlang der gesamten visuellen Bahn nach lokaler RITC-Markierung. Beispiele solcher Schnitte sind auf Abb. 10 und Abb. 11 dargestellt. Die Frage, die bei Betrachtung dieser Ergebnisse aufgeworfen wird, ist folgende: Ist diese retinotope Anordnung von Fasern entlang der dorsoventralen Achse ausreichend, um eine den späteren Retinotopie-Anforderungen entsprechende präzise Projektion herzustellen oder nicht? Wenn das der Fall sein sollte, so sollte man während der Entwicklung auch innerhalb der dorsalen Fasern bzw. innerhalb der ventralen Fasern "geordnete" Verhältnisse finden. Das Beobachten des Verlaufs einzelner Fasern innerhalb des optischen Nerven war sehr schwierig, da Schnitte in der Längsachse des Nerven und auf der richtigen Ebene erforderlich wären.

Solche Beobachtungen waren aber auf dem Tectum möglich, wo für die Auswertung ein Schneiden des Gewebes nicht notwendig war, da die Fasern an der Oberfläche liegen. Hier sieht man, daß einige wenige Fasern die allgemeine Faserrichtung (antero-posterior) kreuzen und eine dorso-ventrale Richtung einnehmen (Abb. 9 und 7). Solche Fasern findet man sowohl am Tag E6 (Abb. 7a), wenn das Stratum opticum noch sehr dünn ist, als auch in späteren Stadien (Abb. 7b, 9a,b,c) und in allen Regionen des Tectums. In bezug auf die

Abb. 9: Anordnung der retinalen Fasern im Stratum opticum auf dem Tectum. a) etwa 0,3-0,5mm anterior zur Faserfront (vgl.Abb.7) sind die retinotectalen Fasern gebündelt. Einzelne Fasern kreuzen die AP-Richtung zur Seite hin (Pfeile). b) in einem stärker faszikulierten Bereich des Stratum opticum (0,6-0,8mm anterior zur Faserfront) findet man auch eine Reihe von seitlich wachsenden Fasern (Pfeile). c) Im mehr anterioren Teil des Stratum opticum, der bei kleiner Vergrößerung eine stark parallele Faszikulierung zeigt, erkennt man bei hoher Auflösung, daß einzelne Fasern ihr Faszikel mehrmals zur Seite hin wechseln (Pfeile). Die AP-Richtung ist für alle drei Bilder die jeweilige Pfeilrichtung.

gestellte Frage, ob die Retinotopie im optischen Nerven allein genügt, um auf dem Tectum die Fasern richtig entlang der DV-Achse zu navigieren, können diese Beobachtungen über den Verlauf einzelner Fasern auf Faserebene so interpretiert werden: Die Retinotopie auf regionaler Ebene wird durch das richtige Ankommen der Fasern in die entsprechenden Felder bestimmt. Das von der Regel abweichende "seitliche" Wachsen von einzelnen Fasern in dorsoventralen Richtungen (Abb.9) bedeutet, daß die retinotope Anordnung der Fasern im optischen Nerven nicht bis in die Einzelfaser-Ebene reicht und daß modulatorische Kräfte auf dem Tectum solche "fehlgeleiteten" Fasern regulieren können. Eine andere Erklärung wäre, daß diese "fehlgeleiteten" Fasern ihr richtiges Projektionsgebiet verpaßt haben und so lange auf dem Tectum "umherirren", bis sie degenerieren. Gegen diese Erklärung sprechen Beobachtungen an Schnitten durch das spätembryonale (E15) und adulte Tectum, in dem in der Region zwischen SO und SGFS von der normalen Richtung abweichende retinotectale Fasern zu finden sind (Abb. 2c). Diese direkt auf der Tectumoberfläche liegenden Fasern entsprechen der Faserfront

a
c
b
10 µm

während der Entwicklung, in der auch die meisten abweichenden Fasern zu finden sind (Abb. 7,9).

Die Methode der lokalen anterograden Markierung wurde auch für Fasern angewandt, die in der Retina auf der temporo-nasalen Achse liegen. Mehr als 15 Embryos wurden temporal und 3 Embryos nasal am Tag E10 markiert. Da die Einwuchsstelle ins Tectum und die Bahnen auf dem Tectum von nasalen und temporalen Fasern identisch sind, war es wichtig zu wissen, an welcher Stelle die Inversion der Achse stattfindet.

Temporale Fasern liegen lateral (temporal) im größten Teil des optischen Nerven, und kurz vor dem Chiasma breiten sie sich über die gesamte lateromediale Achse des Nerven aus.In dieser Form passieren sie das Chiasma. Die Fasern verteilen sich im optischen Trakt sichelförmig über seine ganze lateromediale (dorsoventrale) Achse. Abb. 11c zeigt die Verteilung temporaler Fasern im optischen Trakt am Tag E12.

Die experimentelle Zugänglichkeit der nasalen Augenhälfte ist schlechter als die der temporalen Augenhälfte. Deshalb konnten nur wenige (3) nasal lokalisierte Markierungen erfolgreich durchgeführt werden. Die gefärbten Fasern aus dieser Region belegen zunächst den medialen (nasalen) Teil des optischen Nerven, breiten sich dann vor dem Chiasma aus und vermischen sich entlang der ganzen lateromedialen Achse des Nerven mit Fasern temporalen Ursprungs in der Retina. Die Transformation des runden optischen Nerven in eine laminierte Struktur (Chiasma) und in eine abgeflachte Struktur (opt. Trakt) nach dem Chiasma erschwerten die ge-

naue Beobachtung im und am Chiasma.

Im optischen Trakt erscheinen sowohl nasale als auch temporale Fasern nicht separat voneinander, obwohl temporale Fasern in seinem mehr zentralen Teil und nasale Fasern mehr in seinem dorsalen und ventralen Teil zu finden sind.

Diese Beobachtungen auf der einen Seite, daß nasale und temporale Fasern "vermischt" an der gleichen Stelle auf dem Tectum ankommen, und auf der anderen Seite die Tatsache, daß nasale Fasern auf dem Tectum über das ganze anteriore Tectum hinwegwachsen müssen, um in ihre Terminationsgebiete im posterioren Tectum zu gelangen, während temporale Fasern im anterioren Tectum "aussortiert" werden, führten zu der Überlegung, daß das Tectum bei der Aussortierung dieser Fasern beteiligt sein müßte.

5.1.2. Zentral-periphere Organisation von Fasern aus der temporalen Retinahälfte

Für diese Versuche wurde die temporale Retinahälfte wegen der besseren experimentellen Zugänglichkeit ausgewählt. Im Vordergrund stand die Frage: Wachsen anterior projizierende temporale Fasern in direktem Kontakt mit der Tectumoberfläche und posterior projizierende nasale Fasern über die temporalen Fasern hinweg oder wachsen nur die ersten ankommenden Fasern auf der Tectumoberfläche und alle späteren auf den schon vorhandenen Fasern. Die zentral-periphere Entwicklung der Retina ist aus früheren Versuchen bekannt (Goldberg, 1972; Rager, 1980; Kahn, 1975). Zentral liegende Ganglienzellen senden Axone früher aus als peri-

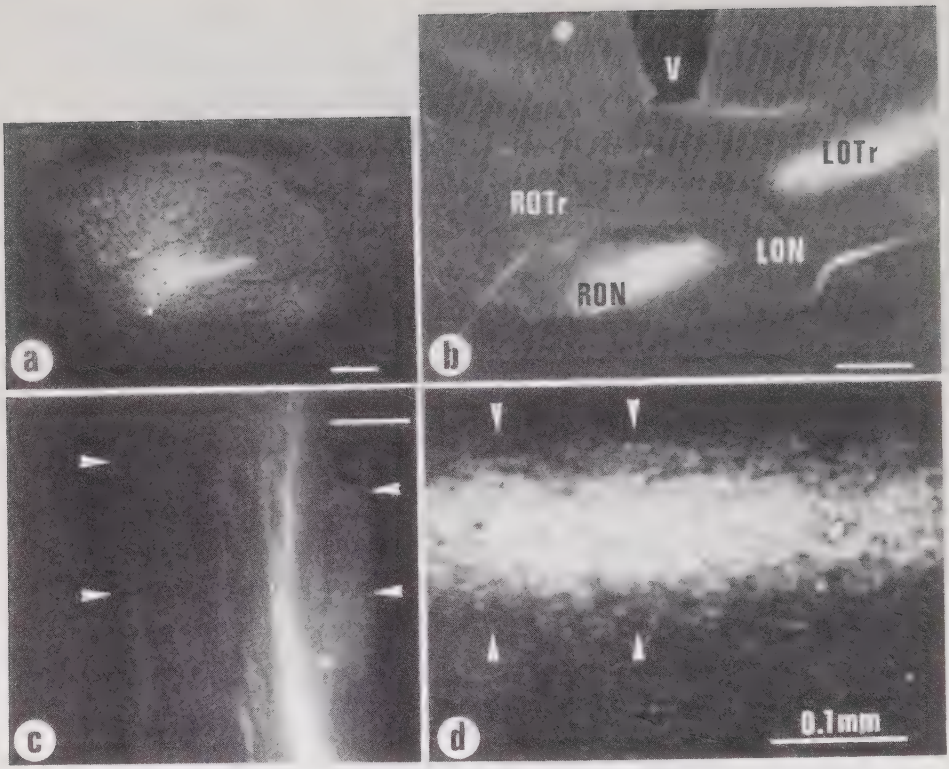


Abb. 10: Frontalschnitte durch die optische Bahn am Tag 12, die den Verlauf zentraler temporaler Fasern zeigen (vgl. Abb.8). a) Schnitt durch den optischen Nerven etwa in der Mitte der Distanz zwischen Auge und Chiasma opticum. Die zentrale Region ist durch die gefärbten Fasern besetzt (weiß). b) Schnitt durch die Chiasmaregion zeigt, wie ein zentrales markiertes Faserbündel (weiß) vom rechten optischen Nerven (RON) in den linken optischen Trakt (LOTr) kreuzt. Das entsprechende Bündel vom linken Auge (LON, ROTr) ist nicht gefärbt (schwarz). V: Ventrikel. c) Schnitt durch den optischen Trakt (in Längsrichtung der Fasern) zeigt gefärbte Fasern (weiß) aus einer mehr zentralen Region in Richtung Tectum (nach oben) wachsen. Die Pfeile (jeweils links und rechts im Bild) markieren die Innen- und Außengrenzen des optischen Traktes. d) Schnitt durch das Stratum opticum am anterioren Pol des Tectums (quer zur Faserrichtung) bei hoher Vergrößerung zeigt, daß mehr zentral gelegene Fasern aus der temporalen Retina in entsprechend tieferen Bereichen des Stratum opticum liegen. Die Pfeile zeigen die Außen- und Innengrenze des Stratum opticum. Der Maßstab ist für alle 4 Photos 0,1mm.

phere Ganglienzellen. Hinzukommende periphere Ganglienzellaxone nehmen die vitreale Seite der optischen Faserschicht ein (Goldberg, 1972). Würden sie nun im optischen Nerven ihre vitreale Bahn halten, so müßten sie in den zentralen Teil des optischen Nerven gelangen. Fawcett (1980) fand beim Xenopus, daß solche peripheren Fasern im optischen Nerven nicht zentral bleiben, sondern sich allmählich in die Peripherie verlagern, und die zentralen Positionen des Nerven werden von zentralen Fasern eingenommen.

In Hühner-Embryonen zwischen den Tagen E8 und E12 wurden bestimmte mehr periphere oder mehr zentrale Positionen in der temporalen Retina mit RITC markiert. Es wurden Schnitte durch das anterograd markierte Gewebe hergestellt, und die markierte (durch gefärbte Fasern besetzte) Fläche wurde entlang der ganzen visuellen Bahn verfolgt (Abb. 10 und 11).

Zentrale Fasern nehmen im optischen Nerven zentrale Stellen ein (Abb. 10). Im optischen Trakt bilden sie seine tieferen Schichten und im Stratum opticum im anterioren Tectum befinden sie sich ebenfalls in tieferen Positionen (Abb.11).

Periphere Fasern sind im Nerven peripher zu finden und bilden im optischen Trakt und im anterioren Stratum opticum die oberflächlichen Schichten (Abb. 11). Sie sind sichtbar in Schnitten durch die gesamten visuelle Bahn (Abb. 11) und in Totalpräparaten auf dem Tectum.

Ähnliche Experimente für die nasale Retina wurden nicht durchgeführt aber die Tatsache, daß nasale periphere Fasern im optischen Nerven peripher liegen, führt zu der Annahme,

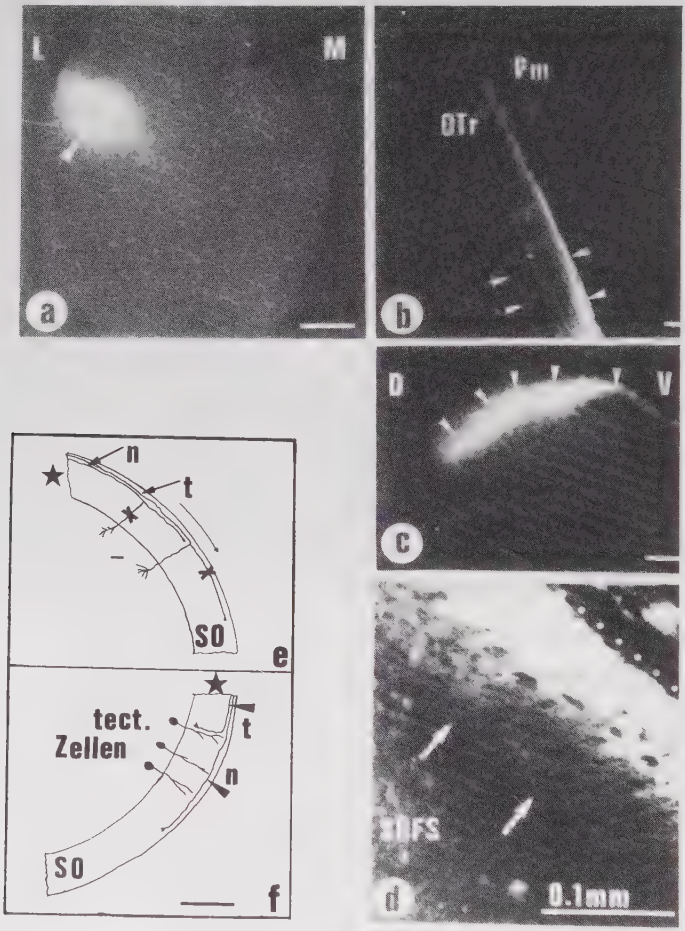

L
M
a
Pm
DTr
b
D
V
c
n
t
SO
e
tect.
Zellen
t
n
SO
f
TFS
0.1mm
d

Abb. 11: Verlauf temporaler peripherer Fasern. a) Querschnitt durch den optischen Nerven. Die durch gefärbte Fasern belegte Fläche (Pfeil) liegt lateral (L) peripher, M: medial. b) Längsschnitt in Faserrichtung im optischen Trakt (OTr). Die Dicke des optischen Traktes nach innen und außen hin ist durch Pfeile gekennzeichnet. Die weiß erscheinende Fläche außen hin stellt die Position der markierten peripheren Fasern dar; Pm: Piamembran. c) Querschnitt durch den optischen Trakt zeigt, daß die temporalen Fasern über die ganze dorso-ventrale Achse verteilt sind (Pfeile); D: dorsal, V: ventral. d) hohe Vergrößerung eines Querschnittes durch das Stratum opticum (SO) am anterioren Tectumpol zeigt, daß die äußere des SO durch markierte Fasern besetzt ist. Die Pfeile zeigen ungefärbte (dunkle) Tectumzellen; SGFS: stratum griseum et fibrosum superficiale. e) Schematischer Schnitt durch das anteriore Stratum opticum am Tag E12, in dem ein möglicher Aussortierungsmechanismus von nasalen peripheren und temporalen peripheren Fasern dargestellt ist. Beide Fasern, nasal (n) und temporal (t), verzweigen sich im Stratum opticum und senden einen Ast in die Tiefe, wobei einer weiterwächst. Mit (x) ist der Ast bezeichnet, der jeweils degeneriert (s. Text, Seite 64). f) Tectale Zellen senden vertikale Fortsätze durch das Stratum opticum hindurch. Sie werden spezifisch von temporalen Fasern (t), aber nicht von nasalen Fasern erkannt (s. Text S. 64). Der Stern für e) und f) zeigt die Position des Eintritts der Fasern ins Tectum.

daß auch hier eine zentral-periphere Organisation der Fasern entlang der ganzen Bahn existiert.

Früh auswachsende (zentrale) Fasern besitzen Wachstumskegel mit vielen Filopodien (Abb. 12a), während spät auswachsende (periphere) Fasern Wachstumskegel mit wenigen oder keinen lateralen Filopodien besitzen (Abb.12b). Dieser Befund hat Bedeutung für die Frage nach den Wegfindungsmechanismen von zentralen und peripheren Fasern. Die große Zahl von Filopodien bei frühen (zentralen) axonalen Wachstumskegeln weist auf multidirektionale Wachstumsbewegungen des wachsenden Kegels hin. Das Fehlen oder das Vorhandensein von nur wenigen (meist in die Längsrichtung des Axons gerichteten) Filopodien legt nahe, daß solche späten (peripheren) Axone sich ihren Weg eher über Wechselwirkungen an vorangegange-

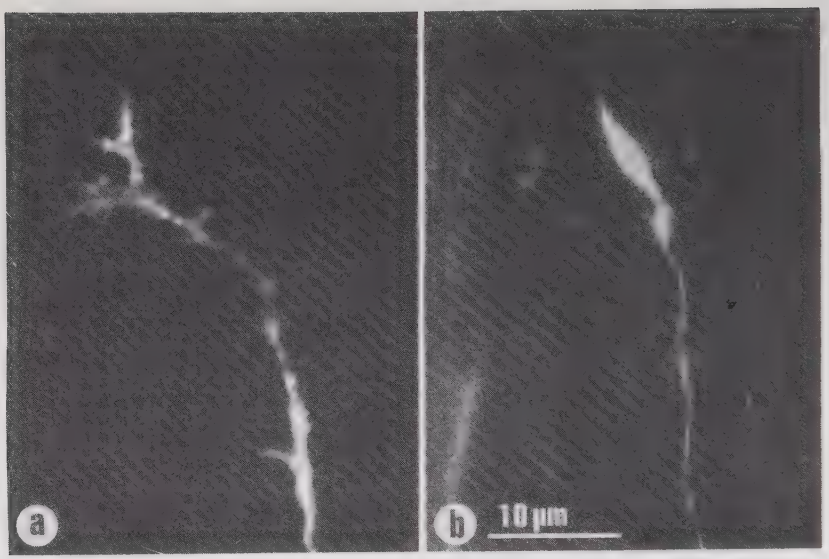


Abb. 12: Wachstumskegel von einem frühen retinalen (a) Axon, das in Kontakt mit der Tectumoberfläche wächst, und von einem späten retinalen Axon (b), das auf präexistierende Axone wächst und keinen direkten Kontakt zur Tectumoberfläche hat. Frühe und späte Wachstumskegel unterscheiden sich in der Anzahl, Länge und Richtung ihrer Filopodien.

nen Axonen finden. Ähnlich wie in Abb. 12 kann das Aussehen der Wachstumskegel in der Retina (Abb. 3b) interpretiert werden. Dort sind zwei Wachstumskegel mit in die Axonlängsrichtung "gerichteten" Filopodien dargestellt.

Diese Befunde zeigen, daß nicht die temporalen Fasern ausschließlich in den tieferen Schichten des Stratum opticum vorkommen, d.h. daß es auch temporale Fasern, nämlich die peripheren, gibt, die nicht direkt in Kontakt mit tectalen Zellen wachsen und trotzdem auf dem anterioren Tectum enden

und Verbindungen eingehen. So taucht hier die Frage auf: Wie findet eine periphere temporale Faser ihr Projektionsgebiet, wenn sie vom Tectum durch eine dicke, retinale Faserschicht (100um) getrennt ist?

Auf diese Frage gibt es folgende mögliche Antworten:

a) Die Fasern sind in der Retina morphogenetisch so programmiert, daß sie, wenn sie eine bestimmte Länge erreichen, ihr Projektionsgebiet treffen werden. Dann stellen sie ihre Elongation ein, tauchen in das Tectum ein und machen Verbindungen mit Zellen im Zielgebiet. Diese Möglichkeit ist noch nicht experimentell überprüfbar.

b) Es wird ein Überschuß an temporalen Fasern produziert. Solche Fasern, die in irgendeiner weise das Zielgebiet erkennen, stoppen, machen Verbindungen und überleben, während solche, die ihr Zielgebiet nicht erkennen (= verpassen), nach posterior weiterwachsen und wegen fehlender Fähigkeit der Umkehrung und der Synapsenbildung degenerieren. Diese Möglichkeit paßt in das Konzept des programmierten selektiven Zelltodes (Rager, 1980; Cowan, 1978; McLoon et al., 1982). Verifizierbar wäre diese Möglichkeit mit lokaler Markierung peripherer temporaler Fasern, die im vordersten Tectumteil projizieren. Bei einer Überschuß-Produktion und Selektion erfolgreich projizierender Fasern sollte man erwarten, daß ein Teil der markierten Fasern ihr Zielgebiet statistisch "verpaßt" haben und sich im posterioren Tectum befinden. Tatsächlich wurden bei alten Embryonen (E12) solche Fasern gefunden, die über ihr Projektionsgebiet hinausgewachsen waren, deren Zahl jedoch quantitativ nicht bestimmt werden konnte. Vereinzelte erreichten relativ poste-

riore Tectumbereiche. Das deutet darauf hin, daß diese Möglichkeit der Überschuß-Produktion von Fasern gegeben ist. Allerdings ist nicht sicher, ob diese auf dem posterioren Tectum anzutreffenden Fasern nicht Kollaterale von bereits in ihr Projektionsgebiet eingetauchten Fasern auf dem anterioren Tectum sind. Weiterhin ist nicht klar, ob einige temporale Fasern nach posterior wachsen, weil di Stellen auf dem anterioren Tectum besetzt sind.

c) Es gibt eine spezifische Erkennung zwischen dem anterioren Tectum und den temporalen Fasern. Diese spezifische Erkennung, die das Eintauchen wachsender peripherer Fasern in tiefere Tectumschichten und die Synapsenbildung ermöglicht, kann:

- chemisch diffusibler oder nicht diffusibler Natur sein (DeLong et al., 1967; Fraser, 1979; Gierer, 1981),
- darin bestehen, daß tectale Zellen Fortsätze durch das Stratum opticum senden. Solche Fortsätze werden von temporalen Fasern erkannt und als Signal zum Eintauchen ins Tectum gewertet.
- Sowohl temporale als auch nasale Fasern senden Kollaterale durch das Stratum opticum hindurch bis in das SGFS, obwohl die Fasern in Richtung posteriores Tectum weiterwachsen. Temporale Kollaterale werden als "richtig" erkannt und überleben, während die Faser, die auf der Oberfläche weitergewachsen war, degeneriert. Dieses Phänomen könnte die oben genannte Möglichkeit (b) erklären, bei der es nach einer Überproduktion an temporalen Fasern aussieht. In einem silberimprägnier-

ten Schnitt von Rager (1980) sieht man eine solche Bifurkation einer Faser auf der Oberfläche des Stratum opticum. Nasale eingetauchte Kollaterale werden als falsch erkannt und degenerieren, während die auf der Oberfläche gewachsene Faser überlebt und weiterwächst. Diese Möglichkeit der Verzweigung von Fasern im Stratum opticum ist auf Abb. 11e bildlich dargestellt. Verzweigungsstelle im Stratum opticum zu finden.

Zusammenfassend lassen sich aus den hier beschriebenen Untersuchungen zur Entwicklung der kontralateralen retinotectalen Projektion und zur retinotopen Organisation innerhalb der visuellen Bahn folgende Punkte herausstellen:

a) Die Umkehrung der dorso-ventralen retinalen Achse geschieht im optischen Nerven, so daß Fasern aus der dorsalen Retina den optischen Trakt und das Tectum ventral erreichen. "Irrläufer" auf der dorsalen Tectumhälfte wurden nicht beobachtet. Ähnlich verhalten sich ventrale Retinafasern, die nur zum dorsalen Tectum hinwachsen. Auf dem Tectum findet man sowohl dorsal als auch ventral Fasern, die der allgemeinen Wachstumsrichtung (anteroposterior) nicht folgen, sondern eine dorsoventrale Richtung einschlagen. Möglicherweise handelt es sich dabei um regionale "Korrekturen".

b) Die Umkehrung der naso-temporalen Achse geschieht auf dem Tectum. Nasale und temporale Fasern erreichen an der gleichen Stelle das Tectum. Die temporalen Fasern werden im anterioren Tectum "abgefangen", während die nasalen weiterwachsen bis zum posterioren Tectum. Einige temporale Fasern bleiben nicht anterior, sondern wachsen auch nach posterior.

Es ist nicht bekannt, ob sie unverzweigt weiterwachsen als "Überschußfasern" oder ob sie Verzweigungen von bereits ins Projektionsgebiet eingetauchten Fasern darstellen.

c) Die zentral-periphere Differenzierung der Retina (Kahn, 1975) hat zur Folge, daß sich eine gewisse "zentral-periphere" Organisation von Fasern in der optischen Bahn einstellt.

6. Experimentelle Ablenkung wachsender retinotectaler Fasern auf dem Tectum

Hindernisse aus Teflon wurden während der Embryonalentwicklung in das Tectum implantiert, und der Verlauf abgelenkter Fasern wurde verfolgt.

Eine wachsende Faser auf dem Tectum, die sich entlang der AP-Achse verlängert, muß mehrere Entscheidungen treffen, wenn sie auf ein mechanisches Hindernis stößt. Solche Entscheidungen trifft die gegebene Faser nicht nur unter experimentellen Bedingungen, wenn sie auf Hindernisse stößt, sondern auch im Normalfall, wenn sie auf piale Blutkapillaren trifft, die vertikal in das Tectum hineinwachsen.

Zunächst muß sich die Faser vor dem Hindernis entscheiden, ob sie überhaupt weiterwächst oder ob sie ihr Wachstum einstellt. Nachdem diese Entscheidung gefallen ist und sie weiterwächst, muß sie die Richtung ihres weiteren Wachstums wählen, d.h. sie kann umkehren, nach rechts oder nach links wachsen. Wenn sie dann am Rand des Hindernisses angekommen ist (rechts oder links), muß sie sich entscheiden, ob sie diese "induzierte" Richtung (DV-Achse) weiterhin beibehält oder ob sie ihre vorherige Richtung wieder einnehmen soll,

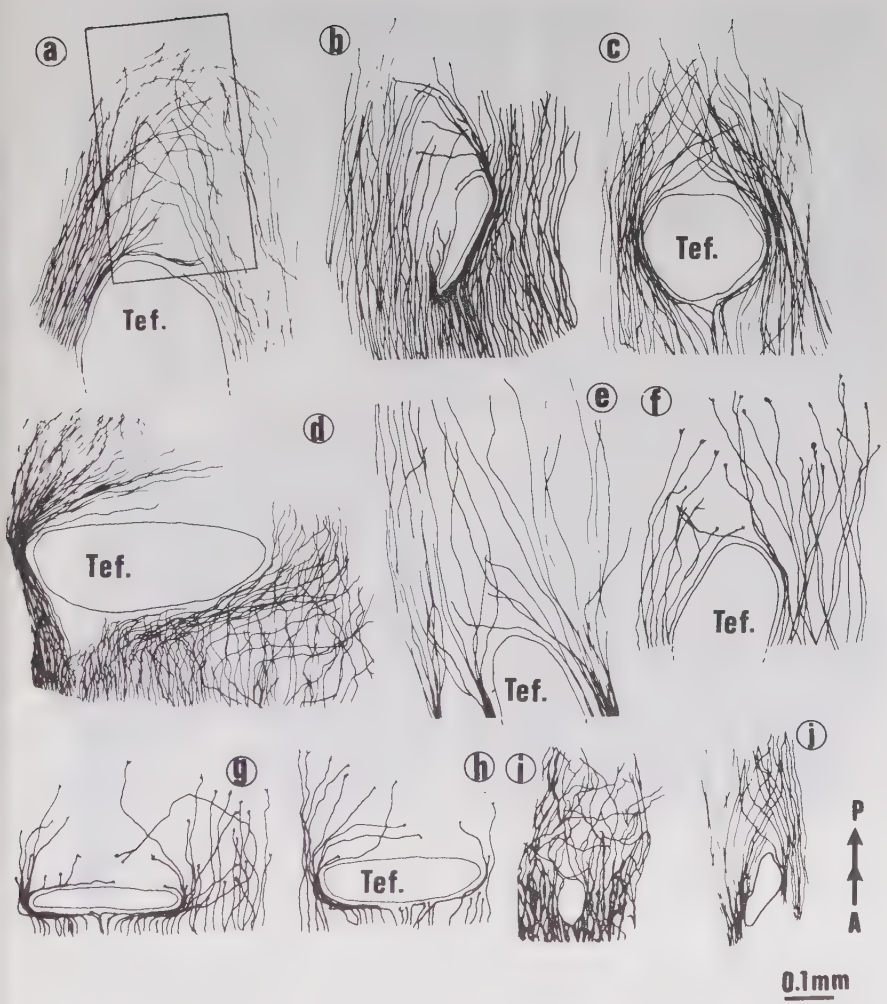


Abb. 13a-j: Camera lucida Zeichnungen, die den Verlauf von abgelenkten retinotectalen Axonen auf dem Tectum zeigen. Man erkennt bei allen dargestellten Versuchen, daß die abgelenkten Fasern sich nach dem Hindernis (Tef.) zurückbiegen und weiter nach posterior wachsen. Hinter dem Hindernis finden Überkreuzungen von Fasern statt (a,b,c,e,f,i,j). Die anteroposteriore Richtung entspricht der Pfeilrichtung rechts unten.

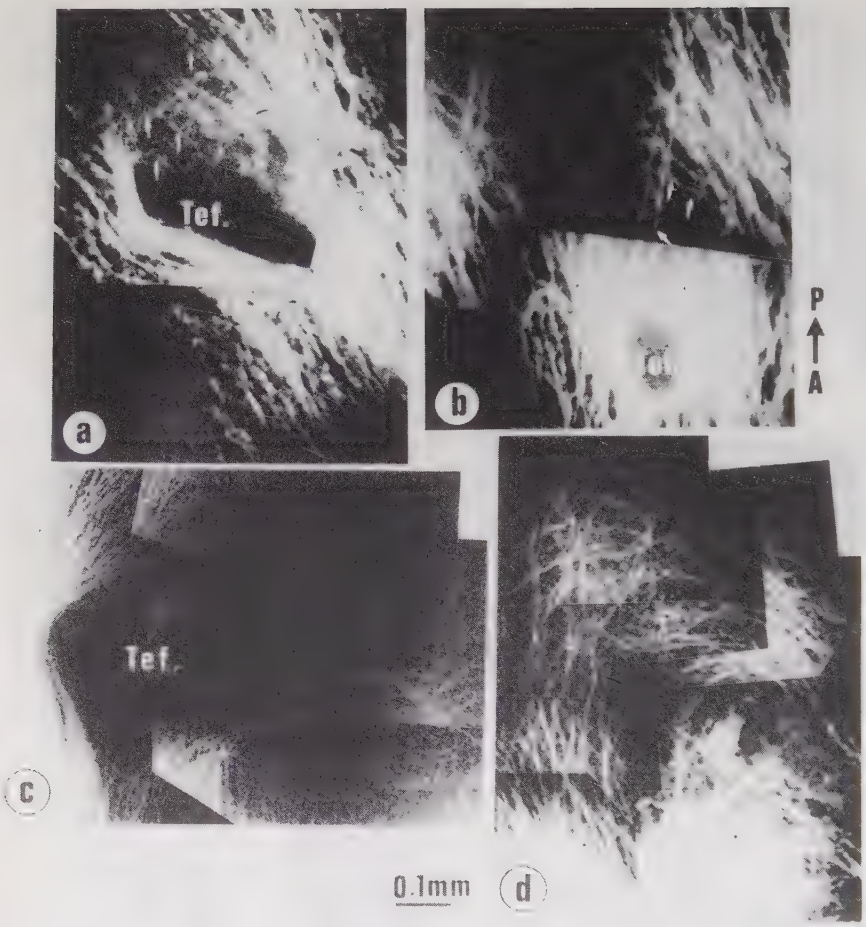


Abb. 14a-d: Fluoreszenzphotographien von tectalen Totalpräparaten nach der Teflonimplantation. a) Das Teflon steht schräg zur anteroposterioren Faserrichtung (ganz rechts A P-Pfeil). Einige Fasern (Pfeile) wachsen direkt hinter das Teflon in den "nicht innervierten Schatten" hinein. b) Fasern von beiden Seiten kreuzen sich nach dem Hindernis (Pfeile). c) Verhalten der Fasern bei einem größeren Hindernis. d) In der Region nach dem Hindernis entsteht ein Geflecht von abgelenkten Fasern aus beiden Richtungen. Das Hindernis selbst ist hier nicht sichtbar. Die hier abgebildeten Photos entsprechen jeweils den Abb. 13b,i,d und a. Die Abbildung d) entspricht der eingezeichneten Position von Abb.13a.

da das Hindernis ihr nicht mehr im Wege steht. Andere nicht abgelenkte Fasern könnten die abgelenkten Fasern in ihrer Entscheidungsfähigkeit beeinflussen. Nach dem Hindernis muß die Faser, vorausgesetzt, sie hat nach dem Hindernis in ihre alte AP-Richtung zurückgefunden,auch die Entscheidung treffen, geradeaus in AP-Richtung zu wachsen oder in den faserleeren Bereich hinter dem Hindernis zu wachsen, wo sie ja auch hinwachsen würde, wäre das Hindernis nicht gewesen. Die vierte Entscheidung fällt eine Faser, wenn sie in den "Schatten" hinter das Hindernis hineingewachsen ist. Die Richtung ist gegenläufig zur Ablenkungsrichtung, d.h. um ihre "normale" Bahn zu finden, muß die Faser sich ein weiteres Mal umbiegen.

Die hier skizzierten Entscheidungsorte und -möglichkeiten vor, an und nach einem Hindernis sind allerdings nicht ausschließlich der Faser zuzuschreiben. Mehrere Faktoren, wie die Mikroumgebung, können das Verhalten der abgelenkten Fasern beeinflussen. Mehr als 50 Experimente mit Rhodamin-gefärbtem und 9 Experimente mit HRP-markiertem retinotectalem System wurden zwischen Tag E9 und E14 ausgewertet. Abb. 13 zeigt eine Reihe von Rhodamin-Experimenten, bei denen das Hindernis eine Größe von 50um bis 0,5mm hatte. Fasern, die direkt auf das Hindernis zuwachsen, werden immer abgelenkt, während solche, die in der Nähe des Hindernisses wachsen, unbeeinflußt bleiben und geradeaus weiterwachsen. Die Ablenkungsrichtung hängt ab von dem zwischen Hindernisachse und Faserrichtung gebildeten Winkel. Ist dieser Winkel 90°, so werden die Fasern mit gleicher Wahrscheinlichkeit nach links oder nach rechts abgebogen (Abb.13g,h). Bei Experimenten, wo

die Fasern zwischen einer stärkeren oder schwächeren Ablenkung entscheiden konnten, wurde beobachtet, daß die Fasern die schwächere Ablenkung bevorzugten (Abb.14a). An der Hinderniskante verhalten sich abgelenkte Fasern unterschiedlich. Obwohl eine quantitative Auswertung nicht durchgeführt wurde, weil die Erkennung einzelner Fasern über lange Distanzen nicht möglich ist, läßt sich erkennen, daß abgelenkte Fasern in das faserleere Gebiet zurückbiegen (Abb.13,14). Deutlich wird dies hauptsächlich in solchen Experimenten, die die Faserfront erfassen (Abb. 13,14).

Der Grund, warum die abgelenkten Fasern sich an der Teflonkante zurückschwenken, ist nicht geklärt. Geradeaus wachsende Fasern, die am Rand des Hindernisses vorbeiwachsen, könnten vielleicht als Leitfasern dienen, zumal diese Fasern gegenüber den abgelenkten Fasern einen Vorsprung von ungefähr der Ablenkungslänge aufweisen. Ein zweiter Grund könnte eine Polarität der Tectumoberfläche sein, der die Fasern erst nach dem Hindernis wieder folgen können. Wenn diese Möglichkeit zuträfe, müßten tectale Oberflächenelemente als mögliche "Führungsfaktoren" für die retinalen Fasern angesehen werden. Ein dritter unwahrscheinlicher Grund für das Zurückschwenken in die anteroposteriore Richtung könnte ein "internes Programm" der abgelenkten Fasern selbst sein. Dieses müßte so aussehen, daß eine Ablenkung eines Axons in eine Richtung beim Fehlen des Ablenkungsgrundes eine Gegenreaktion des Axons hervorruft. Der zweite erwähnte Grund könnte sein, daß die Tectumoberfläche entlang der AP-Achse markiert ist (=Positionsmarkierung). Solch eine Markierung kann eine gradierte Zellober-

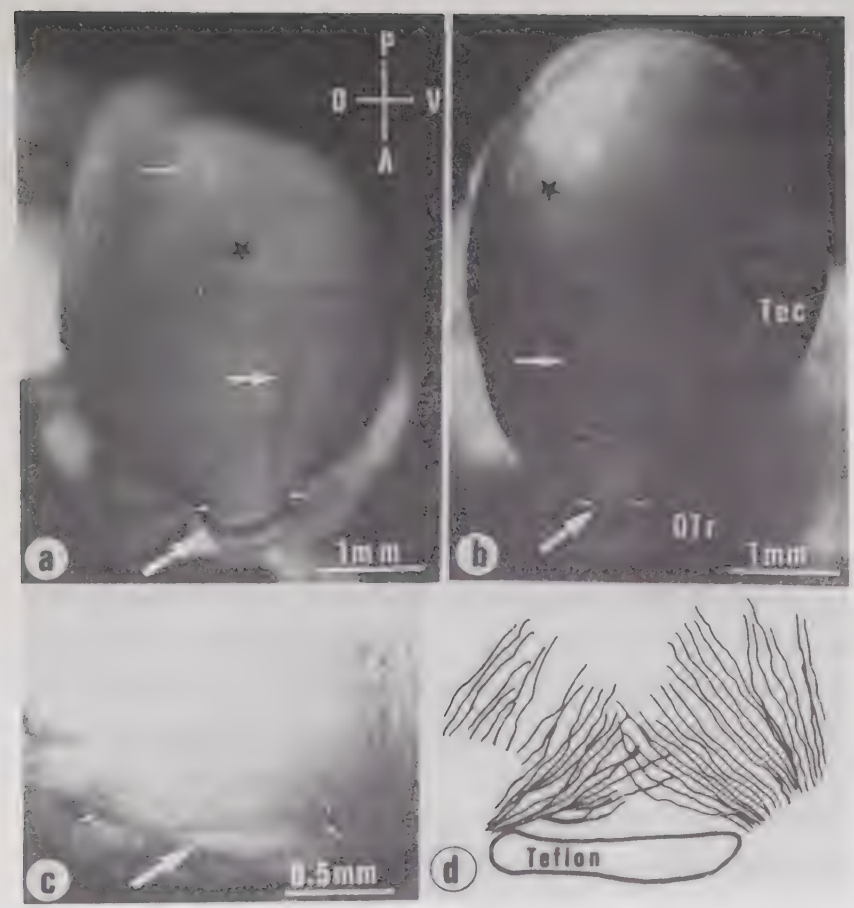


Abb. 15: Verlauf der abgelenkten retinotectalen Fasern in HRP-markierten Totalpräparaten am Tag E11. a) Die Fasern werden im anterioren Tectum durch das Teflon (großer Pfeil) abgelenkt, wachsen zu beiden Seiten des Teflons (kleine Pfeile) weiter und bilden eine Naht (mittelgroßer Pfeil) auf eine Distanz von 1.5 mm. Danach verschwindet die Naht allmählich und das Muster der Faserfront sieht normal aus (*). b) Vergleichbares Präparat zu a). Das Teflon wurde hier bei der Präparation entfernt; seine Position ist durch den großen Pfeil markiert. Weitere Markierung wie in a). OTr: optischer Trakt, Tec: Tectum, A: anterior, P: posterior, D: dorsal, V: ventral. c) Vergleichbares Präparat zu a) und b), in dem die Stelle um das Teflon (Tefl) herausvergrößert wurde. Man erkennt deutlich Fasern, die in den Schatten hinter das Teflon hineinwachsen. Die Zeichnung (d) entspricht dem Bild auf c).

flächen-Markierung oder eine allgemeine gradierte Verteilung einer Substanz nach dem Modell von Gierer (1981) sein. Nach dieser Vorstellung könnte der Gradient eine abgelenkte Faser zurückschwenken und auf ihre "richtige" Position entlang des Gradienten leiten.

Nach dem Hindernis wachsen die abgelenkten Fasern in das faserleere Gebiet hinter dem Teflon ein. Dieser Prozeß des Zurückwachsens erstreckt sich über eine Länge hinter dem Hindernis, die von der Größe des Hindernisses abhängig ist. Es entsteht hinter dem Hindernis ein dreieckiger "Schatten", der zu beiden Seiten von jeweils abgelenkten Fasern besetzt wird (Abb. 13,14). Solche Fasern können sich gegenseitig kreuzen, so daß in einem fortgeschrittenen Stadium ein Geflecht von Fasern entsteht. An der Stelle dieses Geflechts ist später eine "Nahtstelle" von Fasern aus beiden Richtungen zu sehen. Abb. 15 zeigt solche "Nahtstellen". Die Fasern in diesen Versuchen wurden mit HRP anterograd markiert. Die Gründe für das Zurückschwenken von Fasern in das "faserleere" Dreieck sind zu diesem Zeitpunkt nicht verstanden. Einige der oben aufgeführten Gründe für die Richtungskorrektur an der Teflonkante könnten für das Zurückschwenken von Fasern auch gültig sein. Innerhalb des Geflechtes aus einwachsenden Fasern findet ebenfalls eine Richtungskorrektur statt. Man kann einzelne Fasern sehen, die in AP-Richtung abbiegen. Diese Richtung entspricht der Richtung der Fasern vor dem Hindernis (Abb. 14,15).

Ob einzelne Fasern ihre ursprüngliche "Bahn" wiederfinden, ist bis jetzt noch nicht geklärt. Deshalb werden zur Zeit einzelne Fasern durch lokale Rhodamin-Markierung und

durch intrazelluläre Lucifer-Yellow-Markierung verfolgt (nicht veröffentlicht).

Weiterhin ist unbekannt, ob abgelenkte Fasern tatsächlich ihr Projektionsgebiet erreichen und ob sie in diesem Gebiet Verbindungen mit tectalen Zellen eingehen. Anhand des entstehenden Innervationsmusters nach den Hindernissen (Abb.15) vermuten wir, daß tatsächlich eine Korrektur der Projektion stattfindet. Diese rein deskriptive Vermutung bedarf einer experimentellen Verifizierung.

Die Größe und Form des Hindernisses spielt eine wesentliche Rolle beim Innervationsmuster des "Schattens" hinter ihm. Beim runden Hindernis, das einem ins Tectum einwachsenden Blutgefäß ähnelt, wachsen die Fasern tangential um das Hindernis herum und kreuzen sich unmittelbar nach ihm (Abb.13c). Bei großen Teflonstückchen wird eine große Zahl von Fasern abgelenkt, so daß posterior des Hindernisses eine deutliche Nahtstelle zu sehen ist (Abb. 14, 15). Sehr kleine Hindernisse (<0,1 mm) rufen eine Ablenkung weniger Fasern hervor.

Andere Experimente zur Ablenkung retinotectaler Fasern wurden von Fujisawa et al. (1983) beschrieben. Dabei wurde das präsumptive Chiasma am E3 eingeschnitten, so daß in der späteren Entwicklung eine Desorganisation der Fasern entstand. Abgelenkte Fasern fanden sich am Tag E11 und E13 auf ektopischen tectalen Regionen und auf dem ipsilateralen Tectum. Am Tag E16 degenerierten diese "falschen" Fasern, ohne daß sie in ihr richtiges Projektionsgebiet zurückkehrten. Diese Experimente zeigten, daß eine gröbere Ablenkung von Fasern vor dem Erreichen des Tectums für periphere

Fasern auf innerviertem Tectum nicht korrigierbar ist.

7. Transplantation von retinalem Gewebe in nicht-innerviertes Tectum

Die bisher beschriebenen Beobachtungen zur Normalentwicklung der kontralateralen Projektion und zum Verhalten von experimentell abgelenkten Fasern innerhalb dieser Projektion zeigen zusammenfassend:

a) daß innerhalb der retinotectalen Bahn (optischer Nerv und Trakt) eine gewisse Faserordnung anatomischer Natur existiert, wobei die Frage nach dem Grad, den diese Ordnung erreicht, noch offen ist.

b) Innerhalb der Faserpopulation auf dem Tectum gibt es während der Entwicklung einzelne Fasern, die in seitliche Richtungen wachsen und ihr Faserfaszikel mehrmals wechseln. Diese Population von abweichenden Fasern enthält Fasern, die gerade ihre Bahn korrigieren, oder solche, die gerade ihre richtige Bahn verlassen, um in eine falsche Bahn zu gelangen.

c) Die dorso-ventrale Achse wird vor dem Erreichen des Tectums im optischen Nerven invertiert, während die naso-temporale Achse auf dem Tectum selbst invertiert wird.

d) Die zentral-periphere Entwicklung der retinalen Ganglienzellen spiegelt sich in der Schichtung des Stratum opticum wider. Peripherere überwachsen die zentraleren Fasern.

e) Experimentelle Ablenkung von wachsenden Fasern aus der AP-Achse auf dem Tectum führt zu einem Abbiegen von

Fasern in ihre vorherige Richtung, es sei denn, die Ablenkung ist größeren Ausmaßes und geschieht vor dem Erreichen des Tectums (Chiasma) (Fujisawa et al., 1983).

In Zusammenhang mit diesen Beobachtungen und Befunden war es wichtig zu wissen, was geschieht, wenn retinale Fasern auf das Tectum gebracht werden, ohne den normalen optischen Weg zu gehen. Dazu eigneten sich Transplantationsversuche mit retinalen Stückchen auf nicht-innerviertem embryonalem Tectum. Ähnliche Experimente sind von DeLong und Coulombre (1967) und von Goldberg (1974) beschrieben. Die Versuche wurden durchgeführt, wie unter Meth. 2.4. beschrieben. Insgesamt wurden 230 Transplantationen durchgeführt, davon überlebten 48 Embryonen. Es gab einige limitierende Faktoren, die zur geringen Ausbeute von erfolgreich durchgeführten Experimenten führten. Solche waren: a) die geringe Dicke des Tectums am Tag E6 (<50um), so daß viele Transplantate im Ventrikel gefunden wurden oder durch die submeningeale Tasche wieder nach außen herausgelöst wurden. b) Bei einigen Embryonen gab es tectale Anschwellungen an der Einstichstelle, so daß das Tectum bei der Auswertung erheblich deformiert war. Solche Embryonen wurden verworfen. c) Durch die "Injektion" des Transplantates aus der Glaskanüle kam es oft zur Zertrümmerung des Stückchens.

Die verfolgte Arbeitsstrategie war folgende: Retinatransplantate (E6) aus bekannten Retinaquadranten sollten sowohl in ihr normales Projektionsgebiet als auch in andere, Achsen-entgegengesetzte Partien des Tectums implantiert werden. In allen Experimenten war das Auge kontralateral zum Empfänger-Tectum am Tag E3 entfernt worden. Für alle Experi-

mente wurde linke Retina in das rechte denervierte Tectum und umgekehrt rechte Retina in das linke Tectum implantiert, obwohl nach DeLong et al. (1967) die Herkunft aus rechter oder linker Retina ohne Bedeutung sein soll.

Abbildung 17a zeigt schematisch die ausgebreitete 6-Tage-Retina, die nach der Methode von Kern-Veits (1981) und Wolf Reckhaus (persönliche Mitteilung) gefärbt war. DV-Achse und NT-Achse sind eingezeichnet. Mit dem Skalpell wurden Quadranten in der Größe von 0,2-0,3mm^2 herausgeschnitten, numeriert und für die Transplantation verwendet.

7.1. Morphologie auswachsender Neuriten auf dem Tectum

Aus in vitro explantierter Retina (Claviez, 1981; Bonhoeffer und Huf, 1980, 1982) wachsen Neuriten aus. Wenn das embryonale Explantat vorher mit Rhodamin gefärbt war, so sind auch die auswachsenden Neuriten gefärbt (Bonhoeffer und Huf, 1980, 1982). In unseren Experimenten sind die auswachsenden retinalen Neuriten auf dem Tectum intensiv gefärbt (Abb. 16-21). Morphologisch sind sie nicht von normalen retinotectalen Fasern zu unterscheiden. Ihre Wachstumskegel enthalten Rhodamin bis in die feinen Filopodien hinein. Bei einigen Transplantaten (Tab.1-3, jeweils rechte Spalte) wachsen die Fasern als ein Bündel aus dem Transplantat aus. Bei den restlichen Transplantaten wachsen die Fasern entweder radiär oder aus mehreren Stellen des Transplantates aus. Es konnten keine Unterschiede im Bündelungsverhalten der Fasern aus nasaler und temporaler Retina beobachtet werden, wie es in in vitro von Halfter et al. (1981) beschrieben wird. Faserverzweigungen fanden sich selten, und dann waren

die Nebenzweige kurz. Fünf Tage nach der Transplantation konnten noch fluoreszierende Fasern auf dem posterioren Tectum beobachtet werden.

Die Auswertung der Versuche erfolgte an Totalpräparaten unter dem Fluoreszenzmikroskop. Auswertungskriterien für alle Experimente waren: a) Herkunft des Transplantates in der Retina und Implantationsstelle im Tectum. b) Menge der ausgewachsenen Fasern direkt am Transplantat. Bei Versuchen mit mehr als 500 Fasern oder bei Bündelung der auswachsenden Fasern war die Zählung erschwert. Die in den Tabellen 1, 2 und 3 angegebenen Zahlen zeigen deshalb die Größenordnung der jeweils auswachsenden Fasern. d) Richtung oder Richtungen der auswachsenden Fasern direkt am Transplantat wurden bestimmt. Wurde diese Richtung irgendwann geändert, so wurde dies registriert. Die Richtung, in der die meisten Fasern wachsen, ist in Klammer auf den Tabellen eingetragen. Soweit Fasern ihre Richtung ändern, wird dies in den Tabellen in der Spalte "Abbiegen nach" vermerkt. e) Das Bündelungsverhalten der auswachsenden Fasern wurde direkt am Transplantat registriert. f) Die Länge der längsten Fasern ist eingetragen. Ein Mittelwert über alle Faserlängen konnte nicht ermittelt werden, da sehr viele kurze Fasern auswachsen. g) Es wird im Weiteren von Fasern und nicht von Axonen die Rede sein, weil man nicht weiß, welche Fortsätze Axone und welche Fortsätze Dendriten repräsentieren. Deutlich sieht man dies an Einzelzellen, von denen mehr als zwei oder drei Fortsätze auswachsen (Abb. 21c).

Abb. 16: Retinales nasales Transplantat im anterioren Tectum (Position rechts unten eingezeichnet). Die Fasern wachsen aus dem Transplantat nach posterior (nach rechts), dorsal (oben) und ventral (unten). Wenige Fasern, die nach anterior ausgewachsen sind, sind nicht sichtbar. a) Übersichtsaufnahme des ganzen Transplantates. Die weißen Pfeile zeigen nach dorsal oder nach ventral ausgewachsene Fasern, die nach posterior im rechten Winkel abbiegen. b) Herausvergrößerte Stelle um den Stern (dorsal) zeigt deutlich die abbiegenden Fasern an dieser Stelle (Pfeile). Ganz links ist eine primär nach anterior ausgewachsene Faser sichtbar zweimal umgebogen (zwei Pfeile). Die nach dorsal wachsenden Fasern sind im allgemeinen kürzer als die nach posterior ausgewachsenen. c) Herausvergrößerte Stelle um den Stern (ventral) zeigt viele nach posterior abbiegenden Fasern (Pfeile). Die vordersten posterioren Fasern haben eine Länge von 2 mm (auf dem Bild nicht sichtbar).

7.2. Nasale Retinatransplantate

Es wurden 100 Transplantate aus dem Bereich der nasalen Retina entnommen, wie auf Abb. 17a skizziert. Insgesamt wurden 16 Experimente ausgewertet, davon waren 8 anterior, 5 posterior und 3 in der Mitte der AP-Achse implantiert (Tab.1).

Nasale Transplantate im anterioren Tectum.

Die nasale Retina wird in der Normalentwicklung auf das posteriore Tectum projiziert. Aus den 8 ausgewerteten Experimenten wachsen zwischen 50 bis mehr als 500 Fasern pro Transplantat aus. Bei den Versuchen Nr.2, 7 und 50 wachsen die Fasern als ein dickes Bündel oder faszikuliert aus dem Transplantat. Die meisten Fasern richten sich sofort nach dem Auswachsen nach posterior (auf der Tabelle in Klammern zu sehen), während einige Fasern später in diese Richtung abbiegen. Fasern, die nach dorsal, ventral und nach anterior wachsen, sind kürzer und machen mehr "Zickzack"-Bewegungen als solche, die nach posterior wachsen.

Bei den Versuchen Nr.5 und Nr.50 wachsen Fasern zunächst in allen Richtungen aus, jedoch wächst die Mehrzahl

b
10µm
Tr
a
Transplantat
Tr
c
A
P
V

der Fasern nach posterior. Abbildung 16 zeigt fluoreszenzphotomikroskopisch das Resultat von Experiment Nr. 50 als Beispiel für nasale Transplantate in anterioren Partien. Fasern wachsen in allen Richtungen aus. Kurz danach biegen Fasern, die ursprünglich nach ventral oder nach dorsal ausgewachsen sind, in posteriore Richtung ab. Überraschend ist, daß sie im rechten Winkel zu der DV-Achse abbiegen. Außerdem ist in der Abbildung zu sehen, daß nach posterior wachsende Fasern länger und geradliniger sind als solche, die in anderen Richtungen auswachsen.

Nasale Transplantate im posterioren Tectum

Nachdem gezeigt wurde, daß die meisten nasalen Fasern vom anterioren Tectum nach posterior wachsen und daß in andere Richtungen auswachsende Fasern auch nach posterior abbiegen, war es wichtig, das Verhalten von Fasern aus nasalen Transplantaten im posterioren Tectum (Projektionsgebiet) zu studieren. Fünf solcher Experimente wurden ausgewertet (Tab.1). Die meisten Fasern wachsen geradlinig in dorsoventrale Richtungen aus. Abb.17,b,c,d und 18a-c zeigen repräsentative fluoreszenzmikroskopische Photographien von diesen Experimenten. Im posterioren Bereich erkennt man im Hintergrund eine schwach sichtbare parallele Strukturierung des Tectums (Abb.18b). Nasale Fasern folgen streng in dorsoventraler Richtung dieser Strukturierung. Sogar solche Fasern, die nach anterior aus dem Transplantat auswachsen (Nr.9, 62), biegen nach dorsal oder nach ventral ab (Abb.18b). Nasale Fasern verhalten sich im posterioren Tectum anders als im anterioren Tectum. Sie wachsen hier ein-

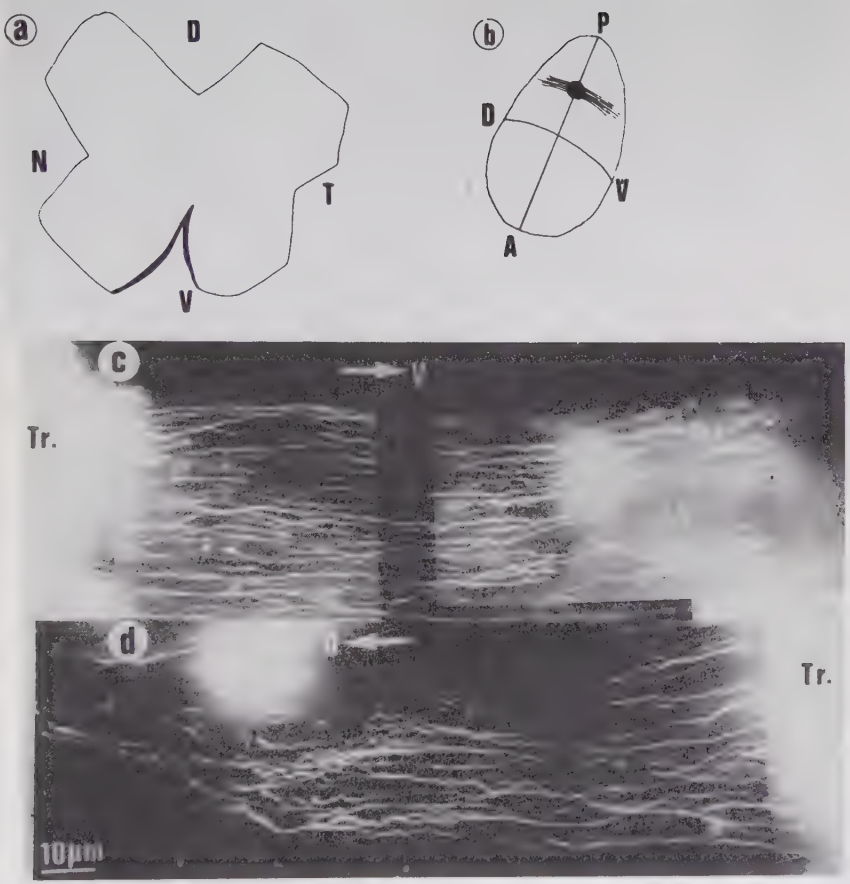


Abb. 17: a) Ausgebreitete Retina am E6, in der die Positionen der jeweiligen retinalen Transplantate markiert sind. Es wurden Stückchen aus dem durch punktierte Linie eingezeichneten Dreieck verwendet. D, N, T und V steht führ dorsal, nasal, temporal und ventral. b) Position und Wachstumsrichtung des unteren Transplantates. c) Nach ventral wachsende Fasern. Das Transplantat (Tr) ist links. d) Nach dorsal wachsende Fasern: Das Transplantat (Tr) ist rechts.

a
Tr
b
Tr
c
A
D
V
P
d
A
D
V
P
e
Tr
10µm

Abb. 18: a,b,c) Nasale Transplantate im posterioren Tectum (auf c), übersichtlich gezeichnet). Die Fasern wachsen nach ventral. Sogar solche Fasern, die leicht nach posterior ausgewachsen sind, biegen sich nach ventral und folgen der dorsoventralen Tectumstrukturierung (auf c mit gestrichelten Linien sichtbar). Auf b) ist diese Strukturierung am besten sichtbar. d,e) Nasales Transplantat (Tr) in der Mitte der antero-posterioren Achse. Die Fasern wachsen als Bündel nach ventral; viele von ihnen biegen nach posterior ab (Pfeile). Nach anterior wachsen wenige Fasern, nach dorsal keine.

deutig "mechanisch" der vorgegebenen Tectumstrukturierung nach. Es sollte bemerkt werden, daß sich das Tectum in antero-posteriore Richtung entwickelt und sich deswegen der anteriore und der posteriore Teil des Tectums nicht in gleichen Entwicklungsstadien befinden.

7.3. Temporale Retinatransplantate

Aus 100 angesetzten Experimenten mit temporalen Transplantaten konnten 21 ausgewertet werden. Davon waren 7 Transplantate anterior, 9 posterior und die restlichen 5 in die Mitte der AP-Achse implantiert. Die temporale Retina wird normalerweise auf das anteriore Tectum projiziert.

Im anterioren Tectum. Die Fasern wachsen in alle Richtungen aus, auch nach posterior. Abb. 19a zeigt ein repräsentatives Experiment, in dem temporale Fasern zu sehen sind, die in dorsoventrale Richtung wachsen. Im Vergleich zu Fasern nasaler Transplantate konnten nur sehr wenige Fasern beobachtet werden (Nr.10*, 12), die nach posterior abgebogen sind.

Im posterioren Tectum. Es war bei diesen Experimenten wichtig zu sehen, ob temporale Fasern eine präferentielle Richtung nach anterior einnehmen, wohin sie in der Normal-

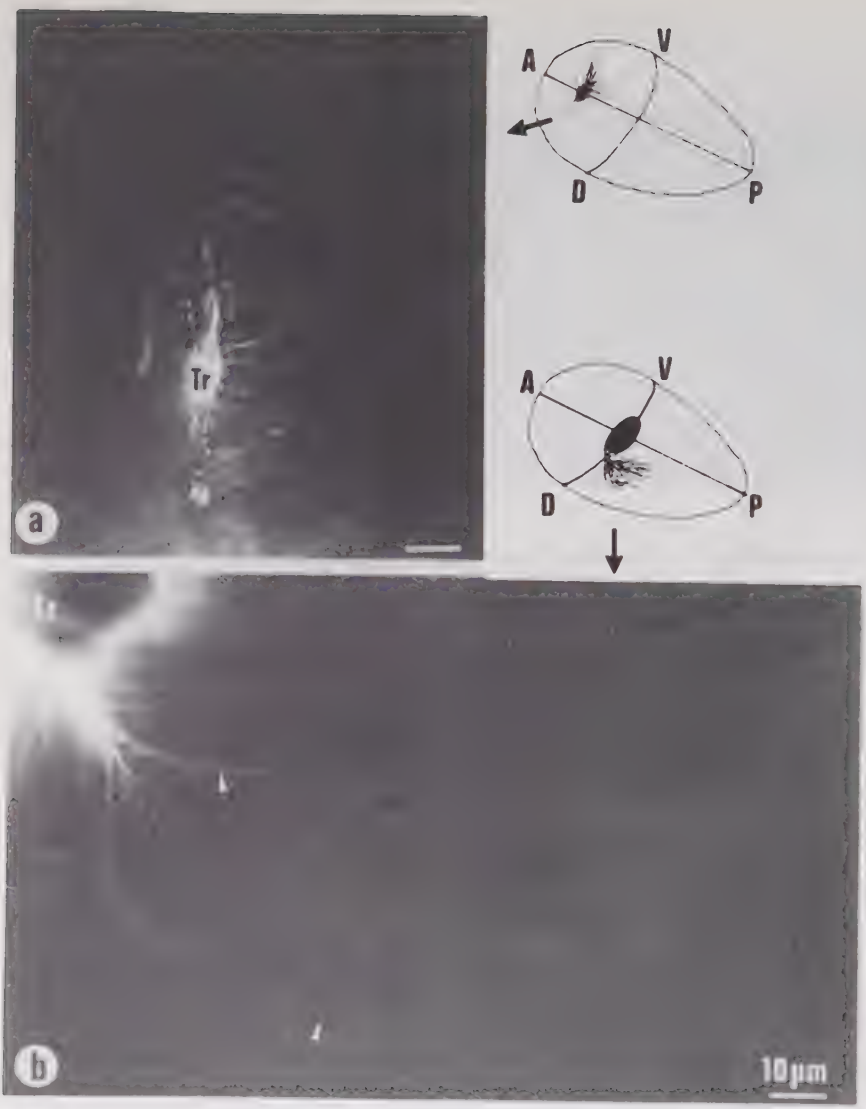


Abb. 19: a) Temporales Transplantat (Tr) im anterioren Tectum. die Fasern wachsen nach ventral und posterior aus (rechts oben die Position des Transplantates). b) Temporales Transplantat (Tr) in der Mitte der antero-posterioren Achse (Position in der Zeichnung sichtbar). Die Fasern wachsen als Bündel nach dorsal aus und biegen dann nach posterior ab. Die Pfeile zeigen zwei solcher typischen abbiegenden Fasern.

Abb. 20: Temporales Retinatransplantat im posterioren Tectum (rechts oben die Position auf dem Tectum eingezeichnet). Die auswachsenden Fasern orientieren sich zunächst nach anterior-dorsal. Viele von ihnen biegen dann nach anterior ab (Pfeile) und wachsen in diese Richtung weiter. Nach posterior wachsen wenige kurze Fasern, nach ventral keine.

Tabelle 1: Nasale Retina-Transplantate

Exp. No.	Transpl.Stelle Anter.	Poster.	Zeit nach Transpl. (Tage)	Faser-menge	Faser-richtung	Abbiegen nach	Faser-länge	Gebündelt
2	+	-		>100	(P) D	P		+
5	+	-		>100	(P)ADV	-		-
7	+	-		ca.100	80 P 20 A	P		+
50	+	-		ca.500	(P)ADV	P		(+)
3	+	-	4	<50	P	-	ca.3	-
70	+	-		ca.60	10 P 50 P	-	ca.1 ca.3	-
8	+	-	5	10	P	-	ca.3	-
6	+	-	2	30	A(P)DV	-	1-2	-
60	-	+	1	>100	V D	-	1-2	-
40	-	+	1	>500	V D	-	2-2.5	-
62	-	+	1	20-30	AP(DV)	-	ca.2	-
9	-	+	1	<20	AP(VD)	-	-	-
64	-	+	1	>100	D	D	2-3	-
	Mitte d. AP-Achse							
71	+		1	>500	D (P)	P	2-3	+
72	+		1	150-200	D (P)	P	ca.2	+
81	+		1	ca.200	(P) D	P	ca.2	+

Tabelle 2: Temporale Retina-Transplantate

Exp. No.	Transpl.Stelle Anter.	Poster.	Zeit nach Transpl. (Tage)	Faser-menge	Faser-richtung	Abbiegen nach	Faser-länge	Gebündelt
11	+	-	1	ca.100	AP(D)(V)	-	-	-
10*	+	-	1	>100	AP(V)(D)	P		+
16	+	-	1	>150	(D)VP	-	2-25	+
12	+	-	1	>500	D A P	P	2-25	+
12A	+	-	1	ca.100	A P V D	-	ca.1	-
14	+	-	1	>500	A P V D	-	ca.2	-
14A	+	-	1	>500	A P V D	-	2-25	+
101	-	+	1	100-200	(V)(A)PD	-	ca.2	-
90	-	+	1	100-200	D V (A)	-	ca.2.5	+
102	-	+	2	>200	(A) P	(A)	2-3	(+)
17	-	+	2	ca.100	(A)		2-3	-
18	-	+	1	>200	(A)	-	ca.1	-
19	-	+	1	<100	A P D V	-	-	-
20	-	+	1	ca.30	(D) (P)	-	ca.1	+
111	-	+	1	100-150	AP(V)(D)	(A)	1-2	+
114	-	+	1	>500	AP(V)(D)	(V)(A)	2-2,5	+
	Mitte d.AP-Achse							
103	+		1	ca.200	V A	-	1-2	+
104	+		1	ca.150	(P) D	(P)	1-2	+
105	+		1	100-150	D	(P)	ca.2	+
107	+		1	100-150	(D)(P)V	(P)	1-2	-
108	+		1		(D)(P)V	-	1-2	+

entwicklung auch projizieren. Bei 6 von 9 Transplantaten zeigen die Fasern tatsächlich eine anteriore Richtung, bei einem (Nr.101) ist keine Richtung erkennbar und bei einem (Nr.20) ist eine bevorzugte Ausrichtung nach posterior erkennbar. Bei allen 9 ausgewerteten Transplantaten findet man um das Transplantat herum viele kurze Fasern (ca. 0,3-0,5mm) einen bis zwei Tage nach der Transplantation. Verfolgt man die Bahn einzelner längerer Fasern, so ist eindeutig, daß nach ventral oder dorsal auswachsende Fasern später über Zickzack-Bahnen nach anterior abbiegen. Im Vergleich zu nasalen Fasern auf dem anterioren Tectum (5.3.2), die fast rechtwinklig nach posterior abbiegen und parallel zum posterioren Tectum wachsen, ist der Faserverlauf temporaler Fasern ungeordnet. Temporale Fasern beschreiben Zickzack-Bahnen, ehe sie nach anterior wachsen (Abb.20). Einzelne Fasern, die nach anterior wachsen, lassen sich über lange Distanzen (3mm) bis zum anterioren Tectumpol verfolgen.

7.4. Transplantate in der Mitte der anteroposterioren Achse

Ist anteriores Tectum für temporale Fasern attraktiver als posteriores Tectum und ist posteriores Tectum attraktiver für nasale Fasern als anteriores Tectum?

Drei Experimente mit nasalen und fünf Experimente mit temporalen Transplantaten wurden ausgewertet.

Nasale Transplantate. Von den nasalen Transplantaten wachsen alle drei nach dorso-posterior. Abb.18d zeigt die Richtungen solcher Fasern. Nach ventral auswachsende Fasern biegen nach posterior ab. Es wird deutlich, daß ein starker Wachs

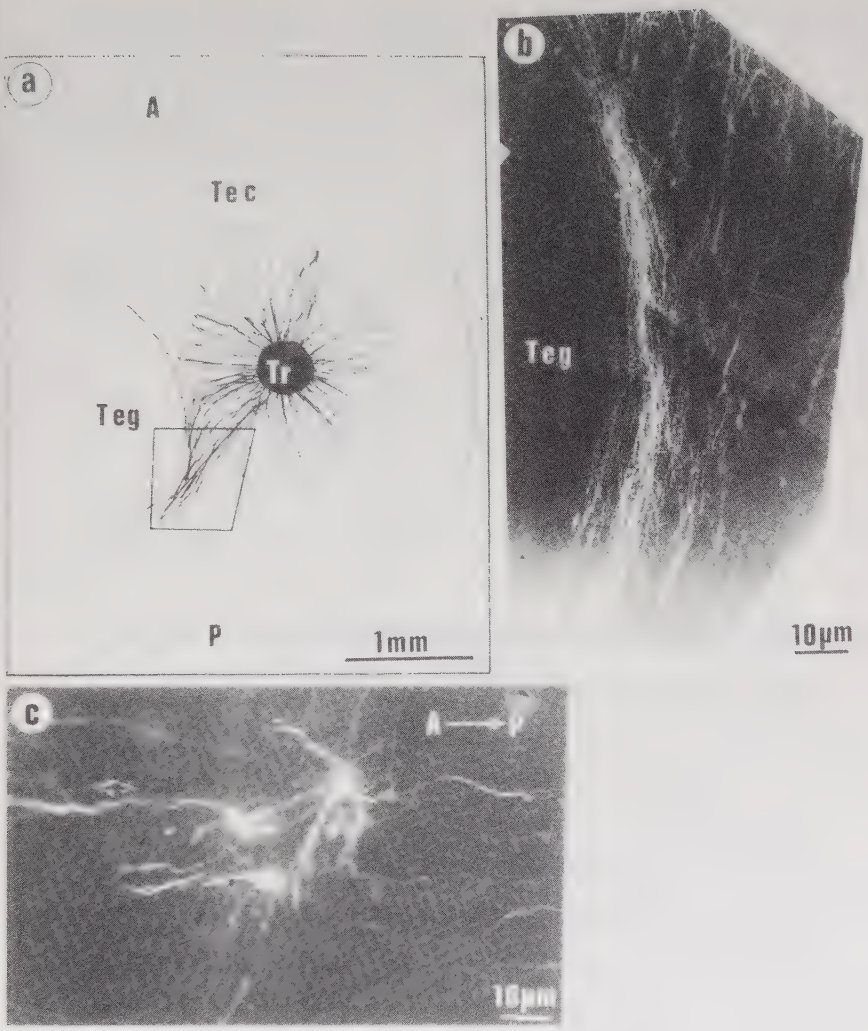


Abb. 21: a,b) Ventrales Transplantat im ventralen Tectum. Auf a) ist die Position des Transplantates (Tr) und das Muster der auswachsenden Fasern eingezeichnet. Die Fasern wachsen radial aus. An der Grenze zum Tegmentum (Teg) bündeln sich die Fasern (Ausschnitt in b sichtbar) und wachsen nach posterior (P). A: Anterior, Tec: Tectum. c) Einzelzellen aus der Retina im Tectum. Man erkennt, daß aus einer Zelle mehrere Fortsätze ausgesandt werden, die hauptsächlich entlang der AP-Achse (rechts-links) und der DV-Achse (oben-unten) wachsen. Anhand dieser Zellen ist auch sichtbar, daß jede Zelle mehrere kurze Fortsätze (Dendriten?) und einen langen Fortsatz (Axon?) bildet.

tumsdrang der Fasern nach posterior besteht. Bündel fächern sich nach etwa 0,5 mm vom Transplantat in einzelne Fasern auf. Nur wenige Fasern aus solchen Transplantaten biegen in anteriore Richtung ab.

Temporale Transplantate (Tabelle 2). In fünf ausgewerteten Experimenten wachsen die Axone des einen nach posterior, eines andern nach ventro-anterior (Nr.103) und die der restlichen drei nach dorso-posterior. Man sieht, daß die Fasern hauptsächlich in posteriore Richtung auswachsen. Viele solcher Fasern biegen nach posterior ab (Nr.104, 105, und 107). In der Abb. 19b sind solche temporale Fasern dargestellt, die nach posterior abbiegen. Es wurde kein morphologischer Unterschied zu den nasalen Fasern gefunden.

7.5. Dorsale und ventrale Retinatransplantate

Fünf ventrale und drei dorsale Retinatransplantate wurden in ventralen oder dorsalen Positionen ins Tectum implantiert (E6). Tabelle 3 enthält die Ergebnisse für die einzelnen Experimente.

Bei ventralen Transplantaten im ventralen Tectum (Nr.25, 26, 27, 30, 31) erkennt man keine bevorzugte Ausrichtung der Fasern nach dorsal; sie wachsen nach allen Richtungen aus, jedoch mit einer schwachen Bevorzugung der posterioren Richtung. Abb. 21a,b zeigt Exp. Nr. 27, bei dem die Fasern in alle Richtungen auswachsen, dann an der Tectum-Tegmentum-Trennlinie sich mechanisch "bündeln" und nach posterior wachsen. Ventrale Retinafasern im dorsalen Tectum verhalten sich ähnlich, sie wachsen radiär aus, mehr nach posterior.

Tabelle 3: Ventrale und dorsale Retina-Transplantate

Exp. No.	Herkunft D	Herkunft V	Position D	Position V	Menge	Richtung	Abbiegen nach	Länge (mm)	Bündelung
30	-	+	-	+	100-150	(P)V,A,D	-	1-1,5	-
31	-	+	-	+	200-250	(P)A,V,D	-	1,5-2	-
25	-	+	-	+	200-300	V	-	ca.2	+
26	-	+	-	+	>100	(P)A,V,D	-	1-2	-
27	-	+	-	+	>500	(P)A,D,V	P	2-3	-
23	+	-	+	-	>100	(A)P,D,V	-	<1	-
24	+	-	+	-	<100	(A,P),D,V	-	<1	-
40	+	-	+	-	100-150	(A,P),D,V	-	1-2	-

Bei dorsalen Transplantaten (Tab.3). Im dorsalen Tectum konnte kein Unterschied zu den ventralen Transplantaten erkannt werden. Sie wachsen ebenfalls in allen Richtungen aus und bevorzugen eine mehr posteriore Richtung.

7.6. Einzelne Retinazellen auf dem Tectum

Bei zwei Kontrollexperimenten wurden einzelne Retinazellen aus der gesamten Retina auf die Tectumoberfläche injiziert, um das Muster der auswachsenden Fortsätze zu betrachten. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Zerspritzen durch eine Pasteurpipette aus einer 6 Tage alten Retina hergestellt. Die Injektion erfolgte mittels einer Glaskanüle, wie bei den Transplantationen ganzer Retinastückchen (Meth. 2.4.3.). Abb.21c zeigt ein solches Experiment, bei

dem die Fortsätze aus den einzelnen Zellen in allen Richtungen wachsen. Man kann nicht unterscheiden, welche Fortsätze Axone sind. Vermutlich aber sind es die längeren Fortsätze der Zellen. Dadurch, daß Retinazellen aus der gesamten Retina injiziert waren, in der sich nicht nur Ganglienzellen befinden, konnte bei diesen Experimenten keine Ausrichtung der auswachsenden Fasern erwartet und auch nicht beobachtet werden.

7.7. Zusammenfassung der Transplantationsergebnisse

Aus den bisher beschriebenen Transplantationsergebnissen am Tag E6 können folgende Punkte zusammengefaßt werden:

- Nasale Fasern, die normalerweise posterior projizieren, wachsen entweder nach posterior aus oder biegen in posteriore Richtung ab, wenn sie aus Transplantaten im anterioren Tectum oder aus Transplantaten in der Mitte der anterio-posterioren Achse auswachsen. Sie wachsen nach ventral und nach dorsal aus, wenn sie aus posterior implantierten Retinatransplantaten auswachsen (7.2. und 7.4.).
- Temporale Fasern, die anterior projizieren, wachsen präferentiell nach dorsal und ventral aus anterior liegenden Transplantaten und nach anterior aus posterior liegenden Trasplantaten (7.3). Sie wachsen präferentiell nach posterior aus Transplantaten in der Mitte der AP-Achse (7.4.).
- Dorsale und ventrale Fasern wachsen in allen Richtungen aus, unabhängig davon, ob sie aus ventral oder dorsal

liegenden Transplantaten auswachsen. Eine Präferenz scheint es in posteriorer Richtung zu geben (7.5.).

Die Ergebnisse aus den Transplantationsexperimenten werden im Kapitel Diskussion besprochen.

8. Bildung und Eliminierung von transienten Projektionen der Retina während der Normalentwicklung

Es ist aus einer Reihe von neuronalen Systemen bekannt, daß transiente Verbindungen während der Embryonalentwicklung angelegt werden (Clarke und Cowan, 1978; McLoon und Lund, 1982). Solche Verbindungen werden auf bisher unbekannte Weise eliminiert. Die bisher am Hühner-Embryo verwendeten Methoden waren nicht geeignet, solche falschen Projektionen quantitativ zu erfassen (Crossland et al., 1975; McLoon und Lund, 1982).

8.1. Projektionen der Retina auf das ipsilaterale Tectum

Man weiß seit kurzem, daß in der Normalentwicklung des Hühnerembryos eine vorübergehende Projektion der Retina auf das ipsilaterale Tectum besteht (McLoon et al., 1982). Die Autoren verwendeten HRP als anterograden Marker für das retino-tectale System und führten die HRP-Nachweisreaktion auf geschnittenem Material durch. Sie fanden, daß diese Projektion auf dem Tectum am Tag E8 erscheint und daß sie nach dem Entwicklungstag E15 nicht mehr vorhanden ist. In

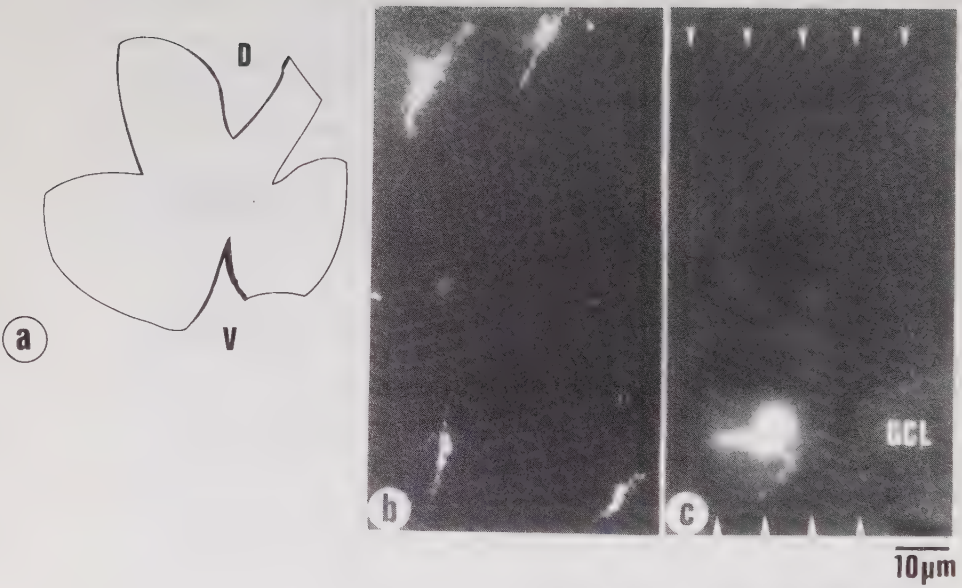


Abb. 22: Ipsilateral projizierende Ganglienzellen in der 11 Tage alten Retina. a) Zeichnung einer ausgebreiteten Retina, in der die Verteilung der ausgezählten Zellen in der zentralen Retina eingetragen ist (punktierte Fläche). b) Fluoreszenzaufnahme in einem Ausschnitt aus der zentralen Retina, mit 4 fluoreszierenden Ganglienzellen. c) Gefrierschnitt durch eine Retina nach retrograder Markierung vom ipsilateralen Tectum aus. Eine typische Zelle in der Ganglienzellschicht (GCL) ist sichtbar. Die Grenze der Retina zum Pigmentepithel hin ist durch die weißen Pfeile gekennzeichnet.

dem folgenden Abschnitt der Arbeit werden einige Daten zu der ipsilateralen Projektion präsentiert, die mit Hilfe der hochauflösenden Rhodamin-Methode gesammelt wurden. Untersucht wurden mit retrograder Markierung der Ursprung der Projektion in der Retina und mit anterograder Markierung die Quantität, der Zeitverlauf, die Ausbreitung und die Elimi-

nierung der Projektion. Die Projektion wird als "normale" ipsilaterale Projektion definiert, um sie von einer "abnormalen" Projektion abzugrenzen, die unter §.2. beschrieben wird.

8.1.1. Ursprung der normalen ipsilateralen-Projektion in der Retina

RITC wurde auf das gesamte anteriore Tectum von 10 Embryonen am Tag E9 appliziert. Am Tag E11 wurden auf Totalpräparate der ipsilateralen Retina die mit Rhodamin retrograd angefärbten Ganglienzellen ausgezählt. In allen vier retinalen Quadranten fanden sich bei allen Embryonen gefärbte Zellen. (Bei der normalen ipsilateralen Projektion der Ratte liegen die Zellkörper im ventro-temporalen Quadranten der Retina (Lund et al., 1975)). Abb. 22a zeigt die Verteilung dieser Zellen. Sie haben eine Dichte von 5-10 Zellen pro 0,005mm^2 in der zentralen Retina. In der Peripherie der Retina befinden sich keine gefärbten Zellen. Abb. 22b,c zeigt ein repräsentatives Feld der zentralen Retina mit ipsilateral projizierenden Zellen.

Um die Quantität und den Zeitverlauf der Projektion mit retrograder Markierung zu verfolgen, wurde bei 36 Embryonen zu verschiedenen Entwicklungsstadien die Projektion gefärbt. Die Menge der gefärbten Zellen zwischen Tag E7 und E16 ist auf Abb. 23a gegen das embryonale Alter eingetragen. Die auf dieser Abbildung präsentierten Zahlen mögen etwas niedriger liegen als die Zahlen der tatsächlich ipsilateral projizierenden Zellen, da man mit der verwendeten Technik möglicherweise nicht alle Zellen retrograd färben kann.

8.1.2. Quantität der ipsilateralen Fasern und Verteilungsmuster auf dem Tectum

Die Gesamtzahl der im optischen Nerven des Huhns ausgezählten Fasern beträgt am Tag E9 etwa $4{,}5 \times 10^6$. Davon bleiben infolge des Zelltods in der Retina nur noch etwa $2{,}4 \times 10^6$ Fasern am Tag E17 übrig (Rager, 1980). Es war von Interesse zu wissen, welcher Anteil der Gesamt-Faserzahl zum ipsilateralen Tectum hinwächst und ob die gesamte Menge dieser Fasern im Laufe der Entwicklung degeneriert. Die Fasern wurden zwischen Tag E3 und E16 mit RITC anterograd gefärbt.

Die ersten ipsilateral wachsenden Fasern konnten am frühen Tag E4 direkt am präsumptiven Chiasma beobachtet werden (Abb.6c, 23a und 25). Zu diesem Zeitpunkt wachsen aus einer Gesamtfaserzahl von 100-150 Fasern etwa 20 bis 30 Fasern nach ipsilateral. Das Verhältnis von ipsilateralen Fasern ist fluoreszenzmikroskoptisch in den Abb. 6 und 24 dargestellt, und die quantitativen Daten sind in Abb.23a für die Embryonaltage E4, E5 und E6 aufgetragen. In den Tagen E5 und E6 konnte die absolute Fasermenge im optischen Trakt bestimmt werden (s. Lengende von Abb.23a). Nach Tag E6 ist eine genaue Auszählung der Fasern wegen der rapiden Zunahme der Dicke des optischen Traktes nicht mehr möglich. Am Tag E7 erreichen die ersten ipsilateralen Fasern das Tectum (einen Tag später als die kontralateralen Fasern). Von diesem Entwicklungstag an konnte die absolute Faserzahl nicht mehr bestimmt werden, und deshalb wurde die Faserzahl entlang einer Linie im anterioren Tectum ausgezählt, die in Abb. 23b die beiden Pfeile verbindet. Die Zahl der ausgezählten Fasern entlang der Linie wurde gegen das Alter der

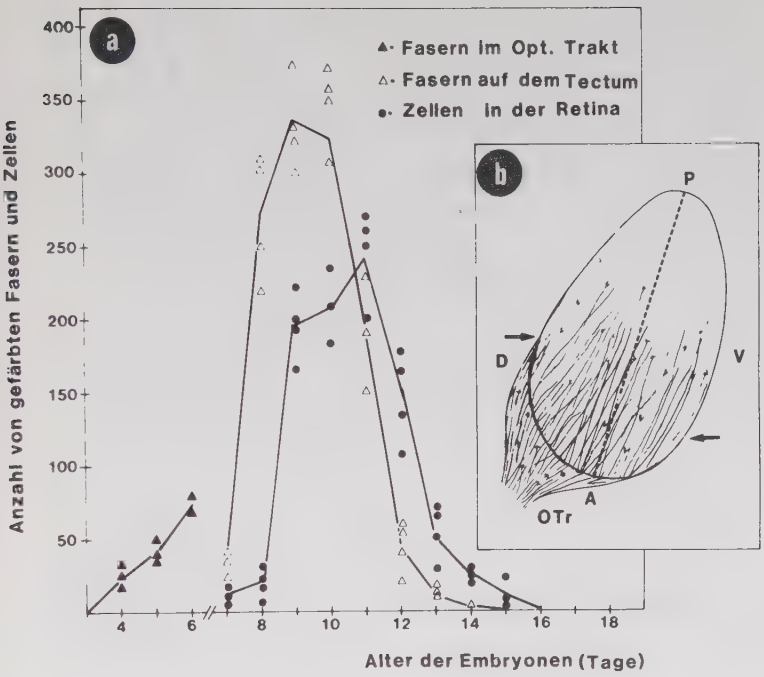


Abb. 23: a) Graphische Darstellung der Entwicklung der ipsilateralen Projektion zwischen den Tagen E3 und E16. 3-4 Embryonen wurden pro Alter verwendet. Die Daten für den optischen Trakt sind absolute Zahlen, während die Daten für das Tectum entlang der markierten dorsoventralen Linie ermittelt wurden. Die Kurve der retrograd markierten Ganglienzellen verläuft um einen Tag zu höherem Alter verschoben parallel zu der Faserkurve. Die Verschiebung ist auf die Dauer des retrograden Transportes zurückzuführen. b) Gezeichnete Darstellung der Verteilung der ipsilteralen Projektion auf das Tectum. die anteriore Hälfte des Tectums wird mit ipsilateralen Fasern besetzt. Eine Original-Fluoreszenzaufnahme ist in Abb. 24a zu sehen. A, D, P, V: Achsenorientierung, OTr: optischer Trakt.

Embryonen auf Abb.23a aufgetragen. Ein maximaler Wert wurde am Tag E9 mit 350-400 Fasern erreicht. In nachfolgende Stadien nahm die Faserzahl ab und erreichte am Tag E16 die Nullinie. Das bedeutet, daß die Projektion am Tag E16 nicht mehr mit Rhodamin anfärbbar ist. Wie oben erwähnt und aus Abb.23a ersichtlich ist, konnte auch mit der retrograden Markierung nach Tag E16 gezeigt werden, daß die ipsilteral projizierenden Fasern nicht mehr vorhanden sind. Aus den quantitativen Messungen konnte die Anzahl der Fasern, die insgesamt während der Entwicklung ipsilateral wachsen, auf 2000-4000 geschätzt werden. Diese Zahl ist sehr gering im Verhältnis zu der Gesamt-Faserzahl im optischen Nerven, die am Tag E9 auf mehr als vier Millionen ermittelt wurde (Rager, 1976, 1980).

In Gefrierschnitten durch das Tectum konnte die Position der ipsilateralen Fasern innerhalb des Stratum opticum untersucht werden. Die ipsilateralen Fasern befinden sich sowohl in der Tiefe als auch an der Oberfläche des Stratum opticum. Abb. 24b zeigt solche Fasern in einem Gefrierschnitt am Tag E9. In Schnittserien durch das ganze Tectum von 6 Embryonen zwischen E9 und E12 fanden wir keine Fasern, die das Stratum opticum verlassen und in das SGFS einwachsen. Das bedeutet, daß der für die Herstellung von Synapsen wichtige Prozeß des Einwachsens von Fasern in das Tectum möglicherweise nicht stattfindet.

8.1.3. Retinotopie der Projektion

Die Möglichkeit, retinale Regionen lokal mit Rhodamin zu markieren und den Verlauf von Fasern aus den markierten Regionen bis zum Tectum zu verfolgen (2.2.), gab uns Anlaß, die Frage nach der Retinotopie der ipsilateralen Projektion anzugehen. Tabelle 4 enthält die Anzahl von gefärbten dorsalen und ventralen Fasern auf dem Tectum. Dorsale Fasern finden sich ausschließlich ventral auf dem Tectum. Das bedeutet, daß eine retinotope Anordnung innerhalb der ipsilateralen Projektion entlang der dorsoventralen Achse existiert. Eine ähnliche Anordnung entlang der naso-temporalen Achse kann mit der gleichen Methode nicht gemessen werden, da nasale und temporale Fasern auf dem anterioren Tectum identische Bereiche besetzen.

Tabelle 4:
Anzahl und Position der Rhodamin-gefärbten Axone auf dem ipsilateralen Tectum am Tag E9 nach RITC-Applikation in der dorsalen oder ventralen Retina

Exp. Nr.	RITC-Appl. in Retina	Position und Zahl der gefärbten Axone auf dem Tectum	
		dorsal	ventral
1	dorsal	1	150
2	dorsal	0	120
3	dorsal	0	85
4	ventral	90	0
5	ventral	50	0
6	ventral	18	0

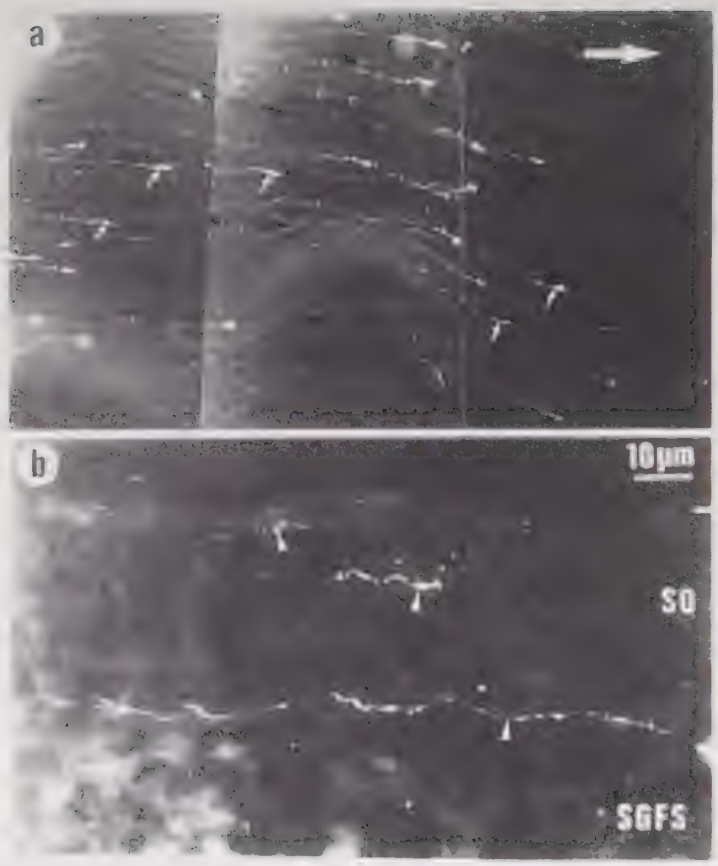


Abb. 24: a) Anterograd gefärbte ipsilaterale Fasern in Aufsicht auf einem Tectum-Totalpräparat am Tag E9. Einige der Wachstumskegel sind mit Pfeilen markiert. Einzelne Fasern können über lange Distanzen beobachtet werden. Die Pfeilrichtung rechts oben entspricht der antero-posterioren Richtung. b) Gefrierschnitt durch die äußeren Tectumschichten (SO: Stratum opticum und SGFS: Stratum griseum et fibrosum superficiale) am Tag E9 zeigt die Positionen ipsilateraler Axone innerhalb des SO (Pfeile).

8.1.4. Bilden kontralaterale retinotectale Axone am Chiasma opticum transiente Kollaterale zum ipsilateralen Tectum?

Diese Frage war bis heute unbeantwortet. Bildung von Kollateralen wurde am visuellen System der Ratte beobachtet (Lund, 1975). Wir hatten zwei Methoden, um diese Frage am retinotectalen System des Hühnerembryos anzugehen:

- anterograde Markierung der Projektion an Tag E3 und E4, wenn die ersten retinotectalen Fasern im optischen Nerven wachsen und das optische Chiasma erreichen (Abb.6 und 25) und
- retrograde Markierung der Projektion mit zwei verschiedenen Farbstoffen von beiden Tecta aus in der Erwartung, daß eine auf beide Tecta projizierende Ganglienzelle eine doppelte Fluoreszenzmarkierung erfährt.

Anterograde Färbung mit Rhodamin an Tag E3 und E4

Abb.25 und Abb.6c (S. 48) zeigen zwei Beispiele, die frühe Ereignisse am Chiasma verdeutlichen sollen. Die geringe Anzahl an Fasern am Tag E4 gibt die Möglichkeit, einzelne Fasern im optischen Nerven am Chiasma und im optischen Trakt zu verfolgen. Mehr als 200 einzelner Fasern wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Bei keiner dieser Fasern konnte nachgewiesen werden, daß sie eine Verzweigung am oder um das Chiasma darstellt. In Abb. 25a,b sind einige solche ipsilaterale Fasern dargestellt. Diese Versuche erlauben keine Beobachtungen direkt im Chiasma, denn aus Abb.25a,b ist nicht klar, ob nicht doch einige der ipsilateralen Fasern Kollaterale sind (kleine Pfeile). Um die Möglichkeit der Kollateralbildung gänzlich auszuschließen, führten wir

retrograde Doppelmarkierungsversuche an Ganglienzellen durch.

Doppelte retrograde Markierung mit RITC und Nuclear Yellow

Bei älteren Embryonen (nach Tag E5) ist die Beobachtung einzelner ipsilateraler Fasern am Chiasma wegen der großen Faserzahl nicht möglich. Deshalb versuchten wir nach dem auf Tabelle 5 skizzierten experimentellen Ansatz, mögliche Kollateralbildung durch doppelte retrograde Markierung zu erfassen. Rhodamin und Nuclear Yellow (Hoechst 5769121) haben die gemeinsame Eigenschaft, in Wasser schwerlöslich zu sein. Diese Eigenschaft erlaubte es, beide Farbstoffe jeweils ungelöst auf das Tectum von 4 Embryonen am Tag E11 zu applizieren. Beide Farbstoffe werden mit einer Geschwindigkeit von 5 bis 10mm/Tag retrograd in den Axonen transportiert. Zwei Tage nach der Färbung (E11) wurden von beiden Embryonen Retina-Totalpräparate hergestellt und die Rhodamin- bzw. NY-positiven Zellen ausgezählt.

In der rechten Retina wurden insgesamt 2.150 Ny-positive (550nm) (= kontralateral) und 1.055 Rhodamin-positive (590 nm) Zellen (= ipsilateral) ausgezählt. In keiner der Zellen fand sich eine doppelte Fluoreszenz. In der linken Retina wurden 7.000 Rhodamin- und 365 NY-positive Zellen ausgezählt. Auch hier fanden sich keine doppelt markierten Zellen. Die Zahlen für die einzelnen Embryonen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Abb. 25c und d zeigen das gleiche Feld in der rechten Retina, in dem beim 520 nm Fluoreszenz-Filter eine NY-positive (kontralaterale) und beim 590 nm Filter eine Rhodamin-positive (ipsilaterale) Zelle zu sehen sind.

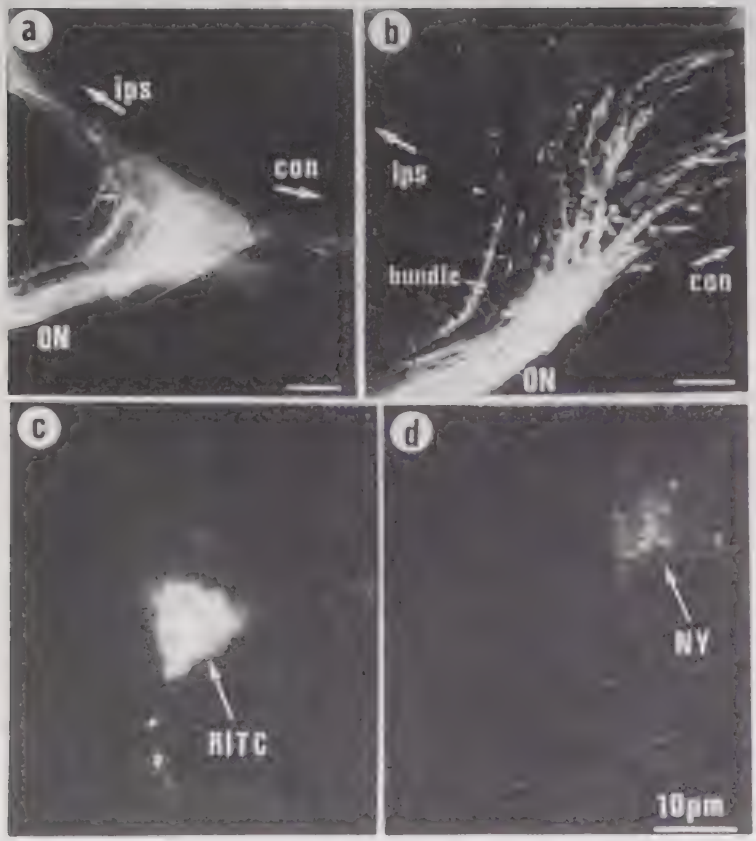
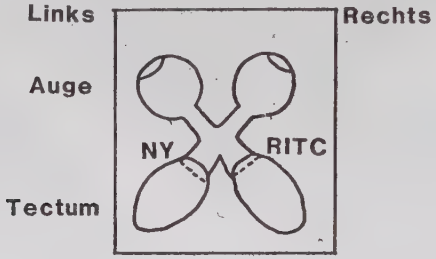


Abb. 25: a,b) Anterograd gefärbte Fasern am Chiasma am Tag E4. durch kleine Pfeile sind einige ipsilateral wachsende Fasern markiert. Einzelne solcher Fasern lassen sich eindeutig (durch Viariation der Fokusebene) bis in den optischen Nerven (ON) verfolgen (a) und sind auf b) als "bundle" gekennzeichnet. Einige lassen sich bis in das Chiasma zurückverfolgen (b); con: contralaterale Richtung, ips: ipsilaterale Richtung. c,d) Das gleiche Retinafeld zeigt 2 nebeneinanderliegende Ganglienzellen am Tag E11, die vom ipsilateralen (rechts) und contralateralen (links) Tectum retrograd mit NY und RITC gefärbt wurden.

Tabelle 5:
Numerische Darstellung retrograd markierter in beide Tecta projizierender Ganglienzellen an Tag E11. Die Schemazeichnung zeigt die Applikationsstellen der Farbstoffe auf dem rechten (RITC) und linken (Nuclar Yellow) Tectum. Die Experimente 1-4 sind identisch. In den Kontrollexperimenten wurden beide Farbstoffe in das rechte Tectum appliziert.

Experimenteller Aufbau



Exper. Nr.	Gezählte Zellen in re. Retina: RITC-positiv	NY-positiv	Doppelt positiv	Gezählte Zellen in li. Retina: RITC-positiv	NY-positiv	Doppelt positiv
1	280	500	0	2.000	85	0
2	150	350	0	1.000	30	0
3	300	800	0	2.000	130	0
4	325	500	0	2.000	120	0
Insgesamt	1.055	2.150	0	7.000	365	0
Kontrollen	120	40	25	1.500	320	140
	50	40	15	1.000	680	230

Diese Befunde zeigen, daß die ipsilateral wachsenden Fasern beim Hühner-Embryo unverzweigte Axone sind, die in irgendeiner Weise am Chiasma einen "falschen" Weg nehmen. Wären hingegen diese Fasern Kollaterale aus Axonen, die normalerweise nach kontralateral wachsen, so müßte man doppelt gefärbte Zellen in den beiden retrograd gefärbten Retinae finden. Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, daß weniger Zellen mit Nuclear Yellow als mit Rhodamin retrograd anfärbbar sind. Der Grund hierfür ist unbekannt. Es erhebt sich aber die Frage, ob überhaupt die Axone die Fähigkeit haben, gleichzeitig beide Farbstoffe aufzunehmen und sie retrograd zu transportieren. Dazu wurden Kontrollexprimente durchgeführt, in denen beide Farbstoffe gleichzeitig in dasselbe Tectum appliziert wurden (Tabelle 5 unten). In beiden Kontrollembryonen konnten doppelmarkierte Zellen sowohl kontralateral als auch ipsilateral gefunden werden. Das zeigt, daß Ganglienzellaxone fähig sind, beide Farbstoffe gleichzeitig aufzunehmen und zu transportieren. Bei diesen Versuchen, waren nicht alle Zellen doppelpositiv; der Grund hierfür hat seine Ursache vermutlich darin, daß Aufnahme und/oder Transport von Nuclear Yellow geringer ist als der von Rhodamin.

Die Beobachtungen, daß eine ipsilaterale Projektion gebildet wird, leiten zu der Frage über, welche Faktoren am Chiasma beim "Umleiten" von Fasern auf die ipsilaterale Hirnseite eine Rolle spielen. Wenn die Fasern ihre Richtung im optischen Nerven beibehalten, so gelangen sie in die kontralaterale Hirnseite, d.h. ein Verbleib auf der ipsilateralen Seite nach dem Chiasma bedeutet eine Richtungsände-

rung der Fasern um etwa 90° (Abb. 6c,25). Es gibt vier mögliche Antworten auf diese Frage nach Umleitungsfaktoren am Chiasma:

1) Die ipsilateralen Fasern werden durch den gleichzeitig ankommenden Nerven des anderen Auges mechanisch umgelenkt.
2) Die Fasern sind Kollaterale aus normalerweie nach kontralateral wachsenden Axonen.
3) Feine Faktoren am Chiasma spielen eine Rolle bei der Erkennung des Chiasma-Neuroepithels durch die ankommenden retinotectalen Axone.
4) Während der Kreuzung von retinalen Fasern zur kontralateralen Seite hin finden statistische Kreuzungsfehler statt.

Bei der ersten Möglichkeit der mechanischen Ablenkung der Fasern durch den anderen optischen Nerven sollte man erwarten, daß eine Entfernung des einen Auges vor dem Tag E4 zu keiner ipsilateralen Projektion des übriggebliebenen Auges führt.

Es wurde bei einer Reihe von Arbeiten über monoculare Hühner-Embryos berichtet, daß eine Entfernung des einen Auges vor Tag E3 zu einer substantiellen Verstärkung der ipsilateralen Projektion führt. Eine Augenentfernung zwischen Tag E3 und E4 führt zu einer weniger ausgeprägten Erhöhung der ipsilateralen Projektion und eine Augenentfernung am und nach E4 führt zu keiner Zunahme der Fasern auf dem ipsilateralen Tectum (Raffin, 1975; Mathers und Ostrach, 1979; O´Leary und Cowan, 1980; Thanos et al., zur Publikation eingereicht). Diese Experimente, die hauptsächlich mit

der HRP-Methode durchgeführt wurden, zeigen, daß die Entfernung des einen optischen Nerven (da keine Retina mehr auf der Seite der Augenentfernung) im Gegensatz zum erwarteten Ergebnis zu einer Erhöhung der ipsilateralen Projektion führt. Somit ist diese Möglichkeit der mechanischen Ablenkung der Fasern durch den optischen Nerven am Chiasma unwahrscheinlich.

Die zweite Möglichkeit der Kollateralbildung am Chiasma wurde durch die oben beschriebenen Experimente ausgeschlossen. Bei diesen Experimenten wurde gezeigt, daß sowohl durch direkte Fluoreszenzmikroskopie am Chiasma an den Embryonaltagen E3 bis E4 als auch durch retrograde Doppelmarkierungsversuche an den Tagen E8-E9 keine Kollateralbildung am Chiasma zum ipsilateralen Tectum gefunden werden konnten. Diese Befunde schließen allerdings nicht aus, daß an anderer Stelle, z.B. im optischen Trakt, Kollaterale von retinotectalen Axonen zu thalamischen Kernen gebildet werden. Die dritte Möglichkeit, daß irgendwelche noch unbekannte Faktoren an der Wegfindung von Fasern überhaupt und speziell hier am Kreuzen von Fasern zur kontralateralen Hirnseite eine Rolle spielen, kann zur Zeit experimentell in vivo nicht verifiziert werden. Frühere Untersuchungen an der zentrifugalen Verbinung zwischen dem isthmo-optischen Nucleus (ION) und der Retina (Clarke et al., 1976, 1978) führten zur Annahme, daß solche subtilen Faktoren am Chiasma wirken. Die Annahme wurde auch auf die retino-tectalen Fasern ausgeweitet, nachdem die oben beschriebenen Enukleationsexperimente zu unterschiedlich starker Bildung einer ipsilateralen Projektion führten, deren Größe vom Zeitpunkt der Enukleation

abhängt (Raffin, 1975; O´Leary und Cowan, 1980).

Wir wiederholten die Enukleationsexprimente an den Tagen E3 und Tag E4 und beobachteten die Faserverteilung am Chiasma am späten Tag E4. Bei Entfernung des einen Auges am E3, d.h. bevor irgendwelche Fasern das Chiasma erreichen, fanden wir eine höhere Faserzahl als bei binocularen Embryonen auf der ipsilateralen Seite am E4 nach anterograder Rhodamin-Markierung. Bei Augenentfernung am frühen E4 (Fasern waren schon am Chiasma) fanden wir, daß die Anzahl der ipsilateralen Fasern am Chiasma gegenüber normalen Embryonen nicht erhöht war. Die Experimente werden hier nicht detailliert beschrieben. sie stimmen mit früheren Ergebnissen anderer Autoren überein. Wichtig ist nach allen diesen Beobachtungen, daß Enukleationen vor dem Zeitpunkt der Ankunft von Fasern am Chiasma zu einer Verstärkung der ipsilateral wachsenden Fasern vom übrigbleibenden Auge führt, während Enukleation nach dem Zeitpunkt der Ankunft von Fasern am Chiasma nicht zu einer solchen verstärkten ipsilateralen Projektion führt. Man darf hier annehmen, daß zusätzlich zur Tendenz der Fasern, geradeaus zu wachsen, die Interaktion der zuerst ankommenden Fasern aus beiden Augen mit den jeweils kontralateralen Neuroepithelregionen nach dem Chiasma für die Wegfindung der später hinzukommenden Fasern wichtig ist.

Diese Interaktion zwischen Fasern und Zellen am Chiasma ist an dieser Stelle indirekt aus den Enukleationsexperimenten sichtbar. Die tatsächliche Natur der Interaktion sowie die Natur von möglichen spezifischen Faktoren ist noch unbekannt. Es scheint, daß gegenseitige Erkennung von Zellen und

Fasern eine Rolle spielen. Dann dürfte die ipsilaterale Projektion auf "Erkennungsfehler" zurückzuführen sein. Die vierte Möglichkeit der zufälligen Fehler am Chiasma ist nicht ausgeschlossen, vielmehr scheint sie zu existieren.

Zusammenfassend scheint es, daß zusätzlich zur Tendenz der retinotectalen Fasern, geradeaus zu wachsen, eine Erkennung von Fasern und Zellen am Chiasma am Kreuzen von Fasern zu der kontralateralen Hirnseite beteiligt ist. Um die Natur der Erkennung zu untersuchen, sind weitere Experimente notwendig; Monoklonale Antikörper gegen Antigene entlang der retinotectalen Bahn, wie sie von Henke-Fahle (1982) hergestellt werden, könnte vielleicht hierfür als Hilfsmittel dienen.

8.1.5. Elimination der ipsilateral wachsenden Axone

Wie aus Abb.22 ersichtlich ist, konnte sowohl mit anterograder als auch mit retrograder Markierung gezeigt werden, daß die ipsilaterale Projektion in normalen Embryonen nach den Tagen E15-E16 nicht mehr präsent ist. Das heißt, die Projektion wird eliminiert oder sie ist nicht mehr anfärbbar. Das gleiche Ergebnis wird von McLoon et al. (1982) mit HRP-Markierung beschrieben mit dem Unterschied, daß diese Autoren keine quantitativen Angaben zur Projektion machen konnten. Für die Antwort auf die Frage, welche Faktoren zur Elimination der Projektion führen, war es notwendig, den Entwicklungszeitpunkt zu finden, zu dem die ipsilateralen Fasern absterben. Das bedeutet: Werden die Fasern eliminiert, nachdem sie unkorrekte Synapsen mit "falschen" Tec-

tumzellen eingegangen sind oder bevor sie die Möglichkeit erhalten, solche Synapsen einzugehen. Die weiterführende Frage ist: Werden ipsilaterale Fasern von kontralateralen Fasern an der Synapsenbildung kompetitiv verdrängt oder werden sie eliminiert, weil sie durch spezifische Erkennungsmechanismen als "falsche" Fasern erkannt werden? Diese Frage wird im nächsten Abschnitt behandelt.

Um zu sehen, wann während der Entwicklung die Fasern absterben, wurden Gefrierschnitte durch das ipsilaterale Tectum hergestellt, nachdem die ipsilaterale Projektion mit Rhodamin anterograd angefärbt war. Ein solcher Schnitt ist auf Abb.24b dargestellt. Die einzelnen fluoreszierenden Axone können gut beobachtet werden, sie liegen sowohl in den tieferen als auch in den mehr oberflächlichen Teilen des Stratum opticum (Abb.24b).

Bei der Auswertung solcher Schnittserien wurde nach Fasern gesucht, die das SO verlassen und in das SGFS einwachsen. Solche Fasern wurden zwischen E10 und E14 nicht gefunden. Es ist bekannt, daß, wenn retinotectale Axone ihr Projektionsgebiet erreicht haben, sie senkrecht in das Tectum einwachsen und daß dann die Synapsenbildung erfolgt (Rager, 1979). In eigenen Kontrollexperimenten konnten kontralateral projizierende Fasern beobachtet werden, die senkrecht in tiefere Tectumschichten einwachsen. Nachdem wir keine solche Fasern gefunden haben, nehmen wir an, daß möglicherweise der Prozeß des Einwachsens von Fasern in die Tectumschichten nicht erfolgt, d.h. ipsilaterale Fasern ereichen nicht das Stadium der Synaptogenese.

Diese Befunde verstärken die Vermutung, daß Herstellung von Verbindungen innerhalb des Tectums für das Überleben der Axone notwendig ist und daß zum Zeitpunkt der Elimination die ipsilateralen Fasern noch innerhalb des SO verlaufen.

Im nächsten Abschnitt wird durch ein experimentelles System gezeigt, daß nicht Kompetition als einziger Grund für die Elimination von ipsilateralen Fasern angesehen werden kann, sondern daß eine fehlende Erkennung von retinalen Fasern und tectalen Zellen und deren Unfähigkeit zur Synapsenbildung untereinander der Grund für die Elimination sein kann.

8.2. Projektionen der Retina auf das ipsilaterale Tectum in monocularen Embryonen

Das System von monocularen Embryonen hat sich als vorteilhaft erwiesen, um Fragen nach möglichen Wechselwirkungsmechanismen zwischen Axonen und Zellen auf dem Tectum zu beantworten. Es wurden 30 Embryonen am Tag E3,5 enukleiert und weiterinkubiert bis zum Tag E8. Zwischen Tag E8 und E16 wurde für jeden Entwicklungstag drei Embryonen HRP in das verbliebene Auge injiziert, und 12 Stunden später wurden beide Tecta für HRP-Histochemie (Meth. 2.7.) verwendet.

Der Zeitverlauf der kontralateralen Projektion bei monocularen Embryonen ist gleich wie bei binocularen Embryonen (Abschn.5). Auf der ipsilateralen Seite erscheinen am Tag E8 HRP-positive Faserbündel im optischen Trakt, die am Tag E10 die Trennungslinie zwischen Diencephalon und dorsalem Tectum erreichen und sich an den Tagen E11 bis E14 auf

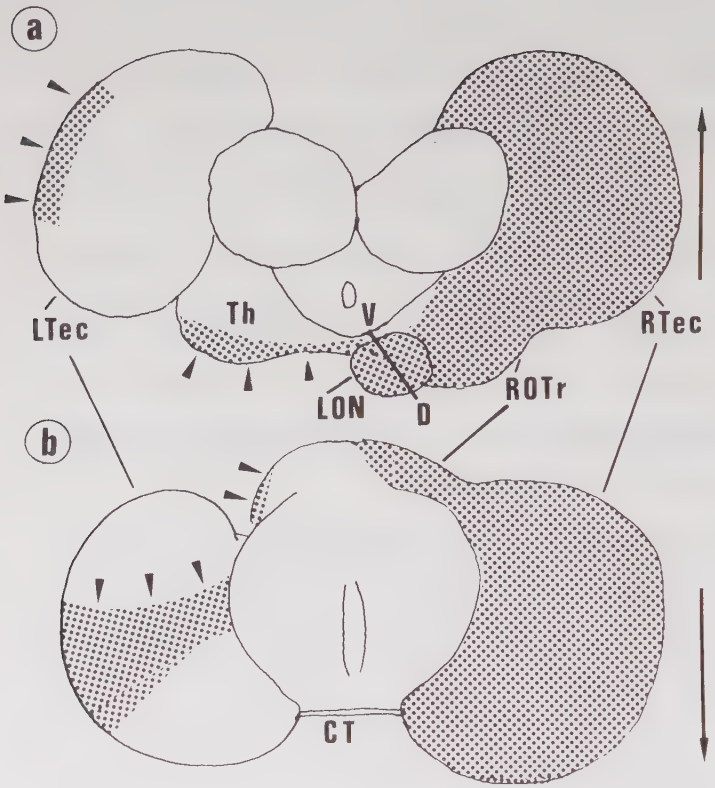


Abb. 26: Camera lucida-Zeichnung des Verlaufs der abnormalen ipsilateralen Projektion (schraffierter Bereich = innerviert). a) Ventrale Ansicht auf das Mesencephalon zeigt den linken optischen Nerven (LON), der in den rechten optischen trakt (ROTr) übergeht und das rechte optische Tectum innerviert (RTec). Ein Teil von ventral liegenden Fasern (Pfeile) wachsen ipsilateral auf dem linken Thalamus (Th). b) Dorsale Ansicht auf das gleiche Mesencephalon zeigt den Verlauf der Fasern (Pfeile) auf dem dorsalen Tectum (LTec). D: dorsal, V: ventral, Teg: Tegmentum. Die Pfeile rects zeigen die jeweilige anteroposteriore Richtung.

der dorsalen Tectumhälfte ausbreiten. Die Abbildungen 26, 27 und 28 geben den Verlauf, das Ausmaß und die Ausbreitung dieser "abnormalen" ipsilateralen Projektion wieder. Die Stelle, an der diese Bündel ankommen - der dorso-mediale Bereich - ist "abnormal", da normalerweise die retinotectalen Fasern sowohl der kontralateralen als auch der "normalen" ipsilateralen Projektion das Tectum an seinem antero-ventralen Teil erreichen.

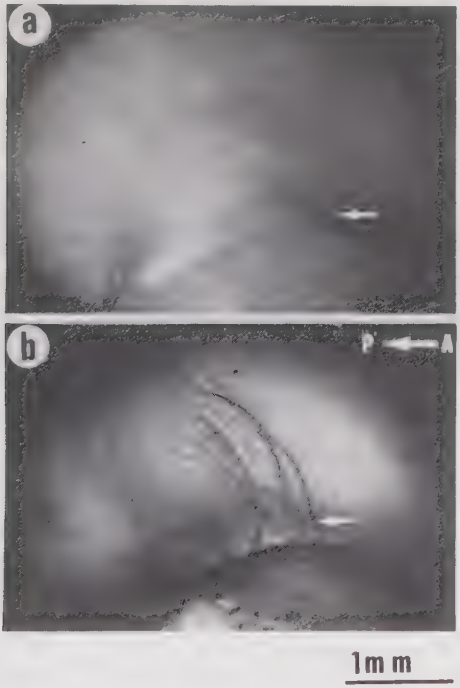


Abb. 27: a,b) Meerrettich-Peroxidase-Markierung der "abnormalen" ipsilateralen Projektion am Tag E12 (a) und E13 (b). Die Faserbündel sind mit Pfeilen markiert. Die Abbildung stellt jeweils die dorsale Tectumfläche dar. A P entspricht der anteroposterioren Richtung. Die abgebildete Fläche entspricht der linken Tectumseite in Abb.26b.

Nach dem Tag E14 (E15 und E16) fanden sich bei 6 Embryonen keine HRP-positiven Fasern auf dem ipsilateralen Tectum. Das Auftreten, der Verlauf und das Fehlen dieser Projektion an Tag E15 und später warf die Fragen auf:

- Aus welchem Bereich der Retina stammt diese Projektion?
- Wieviele Fasern enthält sie?
- Gibt es gleichzeitig zu dieser "abnormalen" Projektion auch die "normale" ipsilaterale Projektion bei enukleierten Embryonen und, wen ja, ist sie vergleichbar mit der "normalen" Projektion bei binocularen Embryonen?

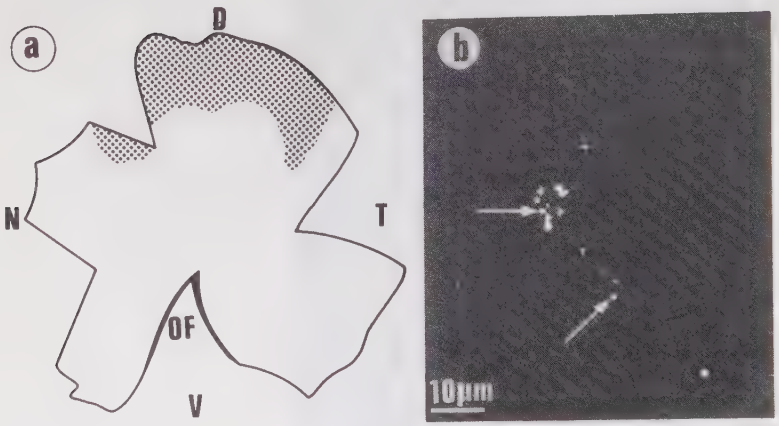


Abb. 28: a) Gezeichnete ausgebreitete Retina am Tag E13 zeigt die Position der ipsilateral projizierenden Zellen in der dorsalen peripheren Retina (schraffierte Fläche). Die Axone dieser Zellen sind auf Abb.26 retrograd dargestellt. Normalerweise projizieren ventrale Fasern auf diese Tectumstelle. b) Eine retrograd gefärbte Ganglienzelle aus der schraffierten Fläche von a) zeigt Rhodamingranula im Zellkörper und in den Fortsätzen der Zelle (Pfeile). OF: Optische Fissur; D, N, T, V: Retinaachsen.

8.2.1. Ursprung und Quantität der "abnormalen" ipsilateralen Projektion

Bei 4 Embryonen wurde am Tag E12 in der Position, wo die abnormale ipsilaterale Projektion auftritt, RITC appliziert. Am Tag E14 wurden Retina-Totalpräparate hergestellt und die Rhodamin-fluoreszierenden Zellen wurden ausgezählt. Alle fluoreszierenden Zellen befinden sich in der dorsalen pripheren Retina. Pro Retina wurden etwa 500 Zellen gezählt. Abb.28a zeigt halbschematisch diese Region in der Retina (schraffiert). In der normalen kontralateralen Projektion wachsen Fasern aus der dorsalen Retina in das ventrale Tectum (DeLong et al., 1965; Crossland et al., 1975). In der "normalen" ipsilateralen Projektion findet man in dieser peripheren Retina-Region keine Zellen (vgl. Abb.22a, S. 94). In der mehr zentralen dorsalen Retina findet man bei der "normalen" ipsilateralen Projektion Zellen (schraffiert in Abb.22a), die aber auf das ventrale und nicht auf das dorsale Tectum projizieren. Zusammengefaßt, der Ursprung dieser Projektion in der Retina ist abnormal.

Mit der verwendeten HRP-Methode lassen sich Faserbündel unter dem Stereomikroskop beobachten; das Auflösungsvermögen der Methode reicht nicht bis in den Einzelfaserbereich. Deshalb wurde Rhodamin verwendet, um das Ausmaß der Projektion zu bestimmen. Drei Embryonen wurden in das übriggebliebene Auge am Tag E11 injiziert. Am Tag E13 wurde das ipsilaterale Tectum nach fluoreszierenden Fasern abgesucht. Innerhalb des Bereiches, der HRP-positive Bündel enthält (Abb.26 und 27), befinden sich etwa 10.000 bis 15.000 einzelne Fasern.

8.2.2. Wird in monocularen Embryonen eine "normale" ipsilaterale Projektion gebildet?

Mit der hochauflösenden Rhodamin-Methode konnte auch die Frage geklärt werden, ob parallel zu dieser "abnormalen" auch die "normale" ipsilaterale Projektion auftritt. Das anteriore Tectum wird tatsächlich von einer kleinen Anzahl von Fasern besetzt. Ihre Zahl entspricht derjenigen normaler ipsilateral projizierender Fasern (Abschn. 8.1.). Um diese Beobachtung abzusichern, applizierten wir bei zwei 12 Tage alten Embryonen RITC in das linke Tectum und bestimmten zwei Tage später die Position und die Zahl der retrograd markierten Zellen in der linken Retina. Alle gefärbten Zellen (ca. 350) befanden sich in der zentralen Retina und waren über alle 4 Quadranten verteilt. Dies zeigt, daß sich parallel zu der mit HRP sichtbaren "abnormalen" Projektion die normale ipsilaterale Projektion ausbildet. Injektionen mit Rhodamin nach dem Tag E15 ergaben, daß auch die "normale" ipsilaterale Projektion in monocularen Embryonen transienten Charakter hat und daß sie nach Tag E16 nicht mehr vorhanden ist.

8.3. Eliminationsmechanismen von "falschen" Projektionen auf dem Tectum

Kompetition von Axonen um Synapsenstellen reicht nicht aus, um die Elimination von "falschen" Projektionen während der Entwicklung des retinotectalen Systems des Huhns zu erklären. In anderen Systemen ist Kompetition als Grund für Zelltod, Elimination und Degeneration angenommen wurden (Lund, 1975, Jacobson, 1978).

Beim Hühner-Embryo scheint sie, wenn überhaupt, eine untergeordnete Rolle zu spielen. Diese Behauptung wird durch die hier beschriebenen Experimente gestützt, bei denen eindeutig eine Elimination der ipsilateralen Projektionen nachgewiesen ist. Andere Mechanismen sind hier wahrscheinlich für diesen "Fasertod" anzunehmen. Die erste Möglichkeit ist der programmierte Fasertod von solchen Verbindungen, die als "Überschuß" produziert wurden. Die Konstanz der Zahl der "falschen" Fasern in beiden beschriebenen Projektionen sowie die Retinotopie der "normalen" ipsilateralen Projektion weisen darauf hin, daß es sich bei den ipsilateralen Projektionen möglicherweise um Entwicklungsfehler innerhalb des Nervensystems oder um phylogenetisch realisierbare Verbindungen handelt, die beim Huhn nicht im adulten Stadium vorkommen, weil das Huhn keine binokularen Überlappungen seiner Gesichtsfelder besitzt. Es wäre bei beiden Möglichkeitenen die Annahme einer programmierten Elimination berechtigt. Eine andere Möglichkeit ist die der spezifischen Faser-Zell-Erkennung. Dafür spricht, daß ipsilaterale Fasern vor dem Eintauchen in tiefere Tectumschichten absterben. Erkennungsspezifität wurde in einem retinotectalen _in vitro_-System experimentell bestätigt (Bonhoeffer und Huf, 1980, 1982). Dabei bevorzugen _in vitro_ auswachsende retinale Axone spezifisch solche tectale Regionen, auf die sie auch in _in vivo_ projizieren. Auch in regenerierenden retinotectalen Systemen von Amphibien wurde gezeigt, daß Fasern über lange Umwege ihr Projektionsgebiet erreichen (Fujisawa et al. 1981). Dieser Befund zeigt, daß auch in Amphibien spezifische Erkennung von retinalen Fasern und tectalen Zellen bei

der Etablierung der retinotectalen Projektion beteiligt ist.

Eine weitere Möglichkeit ist, daß eine spezifische "Rechts-Links"-Unterscheidung im Gehirn existiert, so daß z.B. linke Retina-Fasern nur in der rechten und rechte Retina-Fasern nur in der linken Hirnhälfte überleben und Synapsen bilden können. Diese Möglichkeit ist dann experimentell verifizierbar, wenn die experimentelle Herstellung von Embryonen mit zwei rechten oder zwei linken Tecta gelingt. Als ein erster Hinweis für das Vorhandensein einer solchen Rechts-Links-Entscheidung kann die Tatsache angesehen werden, daß auch in einäugigen Embryonen eine "normale" ipsilaterale Projektion sich entwickelt und später abstirbt.

8.4. Andere Verbindungen der Retina zum Mittelhirn

Die nicht transienten Verbindungen der Retina zu Thalamus- und Mittelhirnkernen der kontralateralen Hirnseite sind detailliert beschrieben worden (Cowan et al., 1961): Crossland et al. (1976) beschreiben eine topographische Abbildung der Retina auf den ventralen Geniculatum-Kern des Huhns. Während der Embryonalentwicklung werden zusätzliche transiente ipsilaterale Projektionen gebildet und eliminiert (McLoon et al., 1982). Retinale Fasern bleiben ipsilateral im optischen Trakt und innervieren kurz nach dem Chiasma ipsilaterale prätectale Kerne und das ipsilaterale Tectum selbst (8.1.).

8.4.1. Gibt es eine transiente Projektion der Retina auf den isthmooptischen Nucleus?

Auffällig ist ein Faserbündel, das am Tag E8 den optischen Trakt kurz nach dem Chiasma verläßt und entlang der dorsomedialen tecto-diencephalen Verbindungslinie wächst (Abb.29a,d). Die Anzahl der Fasern dieses Bündels wurde auf etwa 10.000-15.000 geschätzt (anterograde Rhodaminfärbung). Das Bündel liegt direkt auf dem Hirndach unter den Meningen und ist sowohl mit der Rhodamin- als auch mit der HRP-Markierung nachweisbar (Abb.29). Am Tag E9 bis E10 erreicht das Bündel das postero-mediale Tectum direkt über der Commissura tectalis. Zum gleichen Entwicklungszeitpunkt haben die vordersten retinotectalen Fasern erst die Hälfte der AP-Achse erreicht (Abb.29e). Am Tag E11 ist das Bündel noch vorhanden. Am Tag E12 und später findet man es weder mit HRP- noch mit Rhodaminmarkierung. Von E10-E11 breitet sich das Bündel am postero-medialen Tectum über eine Stelle aus, von der man aus früheren Untersuchungen weiß, daß dort der isthmooptische Nucleus liegt (ION) (Cowan et al., 1961; Clarke et al., 1978). Dieser Kern ist die am weitesten caudal (posterior) liegende Stelle im Gehirn der Vögel, die indirekt über das Tectum Afferenzen aus der Retina erhält und dessen Zellen direkte efferente Verbindungen mit retinalen Amakrinen Zellen eingehen (Cowan et al., 1961; Clarke et al., 1978). Der Zeitpunkt der Entstehung des Kerns selbst und der Verbindung zur Retina, die als isthmooptischer Trakt (IOT) bezeichnet wird, ist bekannt. Bekannt ist weiterhin die Anzahl seiner Zellen und die Tatsache, daß von einer Ge-

samtzellenzahl von 27.000 Zellen am Tag E11 etwa 9.000 bis 10.000 Zellen am Tag E17 überleben (Clarke et al., 1976, 1978). Dies bedeutet, daß im Kern zwischen Tag E11 und E17 eine starke Abnahme der Zellzahl stattfindet. Der Verlauf des IOT ist auch bekannt. Er liegt dorso-medial in der Höhe der zentralen Tectumschichten (SGC) und vermischt sich mit dem optischen Trakt hinter dem Chiasma (Cowan et al., 1961; Clarke, 1978).

Wir beobachteten nach RITC-Injektionen ins Auge, daß am Tag E11 die Zellen des ION mit Rhodamin retrograd gefärbt waren, d.h. Fasern des ION sind in der Retina am Tag E9 bis E10. Abb.29b,c zeigt einen Schnitt durch den ION um Tag E13. Ferner beobachteten wir an Frontalschnitten durch das Mesencephalon am Tag 11, daß sowohl der tieferliegende IOT (retrograd) als auch das oberflächlich liegende dorso-mediale Bündel (anterograd) gefärbt sind. Beide Bündel verlaufen parallel zueinander bis zum posterioren Tectum direkt oberhalb des ION (nicht sichtbar). Vor dem Tectum vermischen sich beide Bündel an der gleichen Stelle mit dem optischen Trakt.

Die Bedeutung des oberflächlich liegenden dorso-medialen Bündels ist uns noch nicht klar. Die Tatsache, daß einzelne Fasern des Bündels am postero-medialen Tectum in die Region hineinwachsen, wo der ION liegt (Abb.29), führt uns zu der Vermutung, daß dieses Bündel mit der Entwicklung des ION und mit der Etablierung der isthmoretinalen Verbindung korreliert sein kann. Die Tatsache, daß das Bündel nach Tag E12 weder mit Rhodamin noch mit HRP anfärbbar ist, läßt erkennen, daß die Fasern des Bündels degenerieren. Um diese

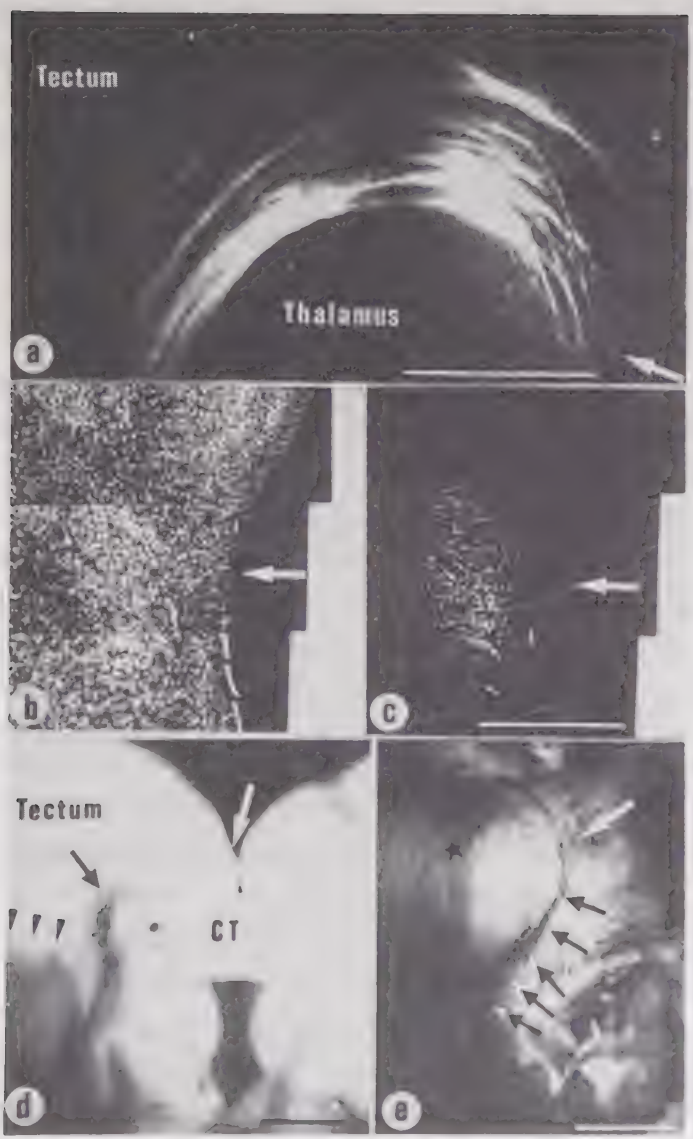
Beobachtung experimentell zu überprüfen, wurde am Tag E10 (Bündel noch vorhanden) HRP ins Auge injiziert. Nach drei Tagen (Tag E13) konnte beobachtet werden, daß an der Stelle des Bündels eine HRP-positive Degenerationsmarke entstand (Abb.29e).

Auf dem Wege zum postero-medialen Tectum und mehr anterior verlassen einzelne Fasern das Bündel und wachsen senkrecht in die Tiefe (unveröffentliche Ergebnisse), wo prätectale Kerne liegen (Cowan et al., 1961). Die Fasern, die den postero-medialen Tectumrand erreichen, könnten als "überschießende" Fasern interpretiert werden, die nach Tag E11 absterben, weil sie ihr Projektionsgebiet "verpaßt" haben. Gegen diese Möglichkeit spricht die Beobachtung, daß die Fasern am postero-medialen Tectumrand am Tag E11 in die Tiefe wachsen.

Die oben aufgestellte Vermutung, dieses Bündel könnte etwas mit dem ION zu tun haben, leitete uns zu der Hypothese, daß transienter Kontakt mit retinalen Fasern für das Überleben der ION-Zellen notwendig ist. Diese Hypothese wird indirekt durch folgende Argumente gestützt: Erstens durch die vergleichbar große Anzahl von Fasern im Bündel (10.000-15.000) am Tag E11 und von überlebenden Zellen im Kern (etwa 27.000 am Tag E11 und 10.000 am Tag E17) (Clarke et al., 1976, 1978). Zweitens, durch das Übereinanderliegen von ION und den Endpositionen der Afferenzen am postero-medialen Tectum (Abb.29a-e). Zur Klärung dieser Hypothese sind weitere Untersuchungen notwendig, wie z.B. elektronenmikroskopische Untersuchungen und andere HRP-Methoden am geschnittenen Material. Solche Untersuchungen werden zur Zeit weiter-

geführt. Es ist nicht klar, warum dieses Bündel in der Literatur für Embryonen nicht beschrieben ist, obwohl die isthmo-retinale efferente Verbindung in mehreren Arbeiten (Perlia, 1889; Wallenberg, 1898; Cowan et al., 1961) detailliert behandelt wurde. Wahrscheinlich liegt es daran, daß andere Methoden mit geringerem Auflösungsvermögen nicht die Möglichkeit gaben, in der frühen Embryonalentwicklung (vor Tag E10 bis E11) eingehende Studien an "kurzlebigen" Projektionen durchzuführen.

Abb. 29: Entwicklung des afferenten dorso-medialen Bündels (DMB).
a) Anterograde Rhodaminmarkierung am Tag E10 (Aufsicht). Das Bündel wächst von links unten (optischer Trakt nicht sichtbar) am dorsalen Tectumrand entlang bis zum posterioren Tectumrand (rechts). Der dicke Pfeil zeigt für alle Aufnahmen die Position, wo sich der ION befindet, und dient der Orientierung. Das DMB besteht aus einigen Faserfaszikeln, die sich über der Position des ION auffächern. Die unterschiedliche Ausleuchtung liegt an der Aufnahmetechnik.
b, c) Retrograde Rhodaminfärbung des ION am Tag E13. b) Frontaler Gefrierschnitt durch das posteriore Mesencephalon. c) Der gleiche Ausschnitt zeigt fluoreszierende ION-Zellen (kleine Pfeile).
d) Anterograde HRP-Färbung am Tag E9 zeigt die Position des DMB (großer schwarzer Pfeil). Die kleineren Pfeile zeigen die retinotectale Faserfront am Tag E9. CT: Commissura tectalis.
e) Das DMB wurde nach intravitrealer HRP-Injektion am Tag E10 und HRP-Histochemie am Tag E13 sichtbar. Man erkennt, daß die Stelle, wo sich das Bündel befand (mehrere Pfeile) durch körniges HRP-Material noch sichtbar ist. Links oben (Sternchen) sind die retinotectalen Fasern sichtbar, die zu diesem Zeitpunkt das posteriore Tectum erreicht haben. Der ION ist in dieser Aufsicht nicht sichtbar, da er in der Tiefe liegt. Der dicke weiße Pfeil zeigt seine Position.
Maßstab für alle Bilder: 1 mm.


Tectum
Thalamus
a
b
c
Tectum
CT
d
e

DISKUSSION

Obwohl bei jedem Abschnitt dieser Arbeit sich ein Diskussionsteil anschließt,werden hier einige Aspekte herausgegriffen und in Zusammenhang mit der grundlegenden Frage der Arbeit nach Faktoren,die die Entwicklung präziser neuronaler Netzwerke beeinflussen, diskutiert.

1) Das verwendete embryonale System wurde hier erstmals für neuroembryologische Untersuchungen eingesetzt.Es bietet gegenüber in ovo wachsenden Embryonen den Vorteil der experimentellen Zugänglichkeit,die für bestimmte neuroembryologische Fragen notwendig ist.

Die Zugänglichkeit des Systems wurde insbesondere bei der Durchführung von mikrochirurgischen Eingriffen im Tectum und bei der Durchführung von lokalen Markierungsmethoden genutzt. Gegenüber in ovo wachsenden Embryonen entwickeln sich die in vitro Embryonen etwas langsamer nach dem zwölften Tag und sie haben den Nachteil,daß sie nicht schlüpfen können,so daß Untersuchungen am adulten retinotectalen System behandelter Embryonen nicht möglich sind.

2) Methodische Prozeduren zur Markierung von Axonen und ihren Zellkörpern in vivo

Hierbei sollten an erster Stelle einige Vorteile des RITC als vitalen Markers herausgestellt werden:
a) Der Farbstoff ist bidirektional in den retinotectalen Axonen transportierbar, ohne daß er auf die Axone oder auf deren Zellkörper toxische Effekte zeigt. Diese Eigenschaft könnte auch für Untersuchungen an anderen neuronalen Syste-

men von Bedeutung sein. b) Der Farbstoff verläßt die Axone und die Zellkörper und läßt Langzeit-Markierung des Systems zu. c) Er wird aus der Umgebung von den Zellen aufgenommen, ohne daß er intrazellulär injiziert werden muß. Somit hat RITC einen Vorteil gegenüber anderen anterograd transportierbaren Fluorochromen,die intrazellulär injiziert werden müssen (Stewart 1981;Stretton und Kravitz 1968). d) RITC ist in Wasser schwerlöslich und eignet sich für lokale Markierungen und für histologische Behandlung des gefärbten Gewebes. e) Der Farbstoff erlaubt in vivo Beobachtung von wachsenden retinotectalen Axonen auf dem Tectum.

Der zweite verwendete Farbstoff Nuclear Yellow wurde zunächst von Bentivoglio et. al.(1979) zur Markierung von Nervenzellen eingeführt. In der vorliegenden Arbeit konnte mit diesem Farbstoff gezeigt werden,daß am Chiasma opticum die retinotectalen Axone sich nicht verzweigen,um Kollaterale in das ipsilaterale Tectum zu senden. Nuclear Yellow ist, wie RITC, in Wasser und in der Embryoflüssigkeit schwerlöslich, fluoresziert in einem anderen Bereich als Rhodamin und wird mit einer ähnlichen Geschwindigkeit wie Rhodamin intraaxonal transportiert, allerdings in bisher nachweisbaren Mengen nur in retrograder Richtung. Die Tatsache,daß mit Nuclear Yellow weniger Zellen retrograd angefärbt werden als mit Rhodamin spricht dafür,daß der Farbstoff entweder schlechter als RITC aufgenommen wird oder daß er nur von einer bestimmten Axonenpopulation aufgenommen wird.

Das Enzym Meerrettich-Peroxidase wurde zunächst von LaVail et al. (1974) als Marker für das retinotectale System

des Huhns eingeführt. Hier wurde eine von Fujisawa et. al. (1981) für das Amphibien-retinotectale System modifizierte HRP-Technik verwendet,die das Enzym im unfixierten Totalpräparat nachweist.

3) Die retinotope Organisation des sich entwickelnden retinotectalen Systems

Die Anordnung von retinalen Fasern in der optischen Bahn während der Entwicklung des Systems ist nicht ein zuffälliger Prozeß. Entsprechend der Achsenposition ihrer Zellkörper in der Retina und entsprechend ihrer frühen oder späten Entwicklung (zentral oder peripher) ordnen sich die retinotectalen Axone während der Entwicklung auf regionaler Ebene innerhalb der optischen Bahn. Die hier beschriebenen Retinotopieverhältnisse sind mit denen im adulten Goldfisch (Scholes 1979) und im adulten Frosch (Fawcett 1980) vergleichbar. Die Besonderheit beim Hühner-Embryo liegt darin, daß während der Zeit,in der die retinotectalen Fasern zum Tectum hinwachsen (E6 bis E9),der anteriore Tectumpol sich nach ventro-lateral dreht (Rogers 1960,Goldberg 1974,eigene Beobachtungen). Diese Rotation des Tectums hat zur Folge, daß Strukturen anterior vom Tectum (optischer Nerv und Trakt) sich auch drehen. Diese anatomischen Rotationen bringen Transformationen der Faseranordnung innerhalb der optischen Bahn mit sich,die mit den hier beschriebenen Methoden sich nicht bis auf Faserebene untersuchen lassen.

Es wäre denkbar, daß auf dem Tectum die Fasern so vorgeordnet ankommen, daß sie sowohl entsprechend ihrer Dorsoventralität als auch entsprechend ihrer nasalen oder temporalen Herkunft in ihre Projektionsgebiete gelangen.

Eine solche Vorordnung der Fasern existiert auf regionaler Ebene entlang der dorso-ventralen Achse, die schon vor dem Eintritt der Fasern in das Tectum invertiert ist. Eine ähnliche Inversion der naso-temporalen Achse vor dem Tectum würde bedeuten, daß die am meisten posterior projizierenden peripheren nasalen Fasern die äußeren Teile des optischen Traktes und daß die am meisten anterior projizierenden peripheren temporalen Fasern die tieferen Teile des optischen Traktes einnehmen müßten. Es wurde aber in dieser Arbeit gezeigt, daß sowohl nasale als auch temporale periphere Fasern die äußeren Teile des optischen Traktes und des anterioren Stratum opticum einnehmen. Das bedeutet, daß auf dem anterioren Tectum temporale periphere Fasern abgefangen werden und in tiefere Tectumschichten eintauchen (wo sie Verbindungen eingehen), während nasale periphere Fasern bis zum posterioren Tectum weiterwachsen.

Zusätzlich wurde gezeigt, daß tiefere Schichten des optischen Traktes von zentralen Fasern, während äußere Schichten von peripherereren Fasern gebildet werden. Das bedeutet, daß die zentral-periphere Entwicklung der Retina (Kahn, 1975; Goldberg, 1972) sich in der optischen Bahn fortsetzt. Dieser Befund erklärt die oben dargestellte Beobachtung, daß sowohl nasale als auch temporale periphere Fasern sich im äußeren Teil des optischen Traktes befinden.

Eine spezifische Erkennung von Fasern aus der Retina und Zellen (oder Zellfortsätzen) im Tectum könnte am Abfangen temporaler Fasern im anterioren Tectum beteiligt sein, obwohl die genaue Wirkungsweise dieser Erkennung experimentell noch zu zeigen ist. Ein möglicher Aussortierungsmecha-

nismus ist die Möglichkeit der Bildung vertikal zur Oberfläche gerichteter tectaler Fortsätze und die Bildung von Verzweigungen auf dem anterioren Tectum sowohl von den nasalen als auch von den temporalen retinalen Fasern. Im letzteren Fall werden nasale Verzweigungen in das anteriore Tectum nicht erkannt und können degenerieren. Genau das Umgekehrte passiert mit den temporalen Fasern,bei denen der oberflächlich wachsende Fortsatz degeneriert,während der in das anteriore Techtum eingewachsene Fortsatz Synapsen eingehen (und überleben) kann.

4) Welche Experimente sprechen für und welche gegen eine Beteiligung des Tectums an der Herstellung der retinotopen Projektion?

Die Daten aus der Literatur lassen zwei verschiedenen Vorstellungen über die Mechanismen der Herstellung einer retinotopen Projektion der Retina auf das Tectum zu. Die erste Vorstellung kann so dargestellt werden: Die retinalen Fasern werden auf dem Tectum sowohl entsprechend ihrer Dorsoventralität als auch entspechend ihrer nasalen oder temporalen Herkunft so geleitet, daß sie unabhängig von ihrem Eintrittspunkt in das Tectum ihr regionalspezifisches Projektionsfeld auf dem Tectum finden. Wichtig für diese Vorstellung ist, daß die Fasern auf dem Tectum auf ihr Ziel ausgerichtet werden durch Interaktion der Wachstumskegel mit der tectalen Oberfläche. Das ist ein aktiver Wegfindungsprozeß.

Die zweite Vorstellung wäre die folgende: Die wachsenden retinalen Fasern werden entsprechend ihrer dorsoventra-

len Position schon vor dem Tectum irgendwie in der optischen Bahn so vorgeordnet, daß sie bei parallelem (nicht suchendem) Auswachsen auf dem Tectum notwendigerweise zu ihrem Zielgebiet gelangen würden. Es muß gefordert werden, daß die Axone das Zielgebiet an seinen antero-posterioren und dorsoventralen Positionsmarkern erkennen und entsprechend Synapsen bilden. Fasern, die aus irgendwelchen Gründen ihr Zielgebiet nicht erreichen oder im Zielgebiet keine Synapsen bilden, sterben ab.

Es gibt Argumente sowohl für die eine als auch für die andere Vorstellung (Rager, 1979, 1980 Review; Cowan, 1978 Review; Jacobson, 1978; Fujisawa et al., 1981).

An dieser Stelle werden die Ergebnisse dieser Arbeit unter dem Gesichtspunkt diskutiert, ob sie für eine der beiden dargelegten Vorstellungen sprechen oder nicht.

Verlauf abgelenkter Fasern auf dem Tectum (Ergebnisse 6.)

Die Ergebnisse sprechen für Korrekturen der Bahnen wachsender retinotectaler Fasern auf dem Tectum, obwohl einzelne "korrigierte" Faserbahnen noch nicht individuell verfolgt werden konnten. Aus dem Gesamtmuster läßt sich nur der grobe Faserverlauf erkennen. In der vorliegenden Form kann dieses Experiment als schlüssiges Argument weder für das eine noch für das andere Modell herangezogen werden. Die Tatsache aber, daß viele Fasern nach der Ablenkung gleich in den "Schatten" hinter das Hindernis hineinschwenken und daß sie nicht zufällige Routen einnehmen, spricht eher dafür, daß das Tectum über Markierungen im Sinne einer Chemoaffinität an der Wegfindung abgelenkter Fasern beteiligt sein

könnte. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu zeigen, daß einzelne Fasern nach dem Hindernis aktiv ihre spezifische dorso-ventrale Postion Bahn wieder einnehmen. In solchen Experimenten müssen einzelne Axone kurz vor dem Hinternis fluoreszent markiert werden. Ihr Verlauf soll dann bis nach dem Hindernis beobachtet werden.

Verlauf auswachsender Fasern aus retinalen Transplantaten

Frühere Transplantationsexperimente embryonaler Retina auf nichtinnerviertes Tectum wurden von Delong und Coulombre (1967) durchgeführt und von Goldberg (1974) wiederholt. Die Ergebnisse von Delong und Coulombre zeigten spezifisches Ausrichten der auswachsenden Fasern und wurden von den Autoren so interpretiert, daß unabhängig von der Position der Transplantate sich auswachsende Fasern zu ihrem der retinalen Herkunft entsprechenden normalen Projektionsgebiet hin ausrichten. Das weist auf eine "führende" Kraft auf dem Tectum hin, die in beiden Richtungen (dorso-ventral und antero-posterior) wirksam ist. Die Interpretation der Ergebnisse wurde so ausgelegt, daß aktive Mitbeteiligung des Tectums an der Wegfindung der retinalen Fasern vorhanden ist. Die Ergebnisse von Goldberg (1974), die im experimentellen Aufbau identisch mit den oben genannten waren, zeigen eine Ausrichtung der meisten auswachsenden Fasern nach posterior, unabhängig von der Position des Transplantates auf dem Tectum und von der retinalen Herkunft des Transplantates. Die Ergebnisse der beiden erwähnten Arbeiten zeigen einen starken Widerspruch zueinander, obwohl sie unter gleichen experimentellen Bedingungen durchgeführt wurden. Es war

unser Ziel, diesen Widerspruch am gleichen System mit anderen experimentellen Techniken zu klären.

In der vorliegenden Arbeit wurde einerseits die Transplantationstechnik gegenüber den oben zitierten Arbeiten verändert, und andererseits wurde die Fluoreszenzmarkierungstechnik von auswachsenden Fasern verwendet (s. Ergebnisse 7.). Die hier verwendete Transplantationstechnik hat den Vorteil, daß gegenüber den früheren Arbeiten die Transplantate in definierte Positionen implantiert wurden (anterior, posterior, dorsal oder ventral) und daß die auswachsenden Fasern aus den Transplantaten direkt in Kontakt mit der Tectumoberfläche standen. Es sei hier bemerkt, daß die Autoren der oben erwähnten Arbeiten die Transplantate hauptsächlich auf die meningealen Membranen transplantierten.

Wenn die erste Vorstellung zuträfe, daß die Fasern auf dem Tectum in ihr jeweiliges Projektionsgebiet gelangen, unabhängig davon, wo sie auf dem Tectum ankommen, dann sollten in unseren Transplantationsversuchen folgende Ergebnisse erreicht werden:

Fasern aus nasalen Transplantaten sollten nach posterior wachsen, wenn die Transplantate anterior oder zwischen anteriorem und posteriorem Tectum liegen, und sie sollten posterior bleiben, wenn sie aus posterior liegenden nasalen Transplantaten stammen. Das Ergebnis der Arbeit stimmt für nasale Fasern mit dem nach dem ersten Modell erwarteten Ergebnis überein. Fasern aus nasalen Transplantaten im anterioren Tectum oder in der Mitte des Tectums richten sich streng nach posterior, oder sie biegen fast senkrecht nach

posterior ab, falls sie eine andere Auswachsrichtung haben (s. Erg. 7.2.). Die abbiegenden Fasern wachsen dann parallel zueinander nach posterior. Sie wachsen sogar paralleler als frühe retinale Fasern, die über die normale retinotectale Bahn in das Tectum gelangen (s. Erg.5). Aus posterior liegenden nasalen Transplantaten bleiben die Fasern posterior, wachsen in dorsale und ventrale Richtungen aus und folgen einer tectalen Oberflächenstrukturierung, die zu diesem Entwicklungszeitpunkt auf dem posterioren Tectum vorkommt. Eine ähnliche dorsoventral verlaufende Tectumstreifung findet man auf dem anterioren Tectum an den Tagen E4 bis E5, aber nicht mehr nach dem Tag E5. Die Streifung ist auch im posterioren Tectum nach dem Tag E8 nicht mehr erkennbar (Goldberg, 1974).

Fasern aus temporalen Transplantaten sollten sich, was die präferentielle Ausrichtung anbelangt, umgekehrt zu den nasalen Fasern verhalten. Das Ergebnis sieht so aus: Aus posterior implantierten Transplantaten wachsen die Fasern nach dorsal, ventral (wie nasale Fasern), aber im Gegensatz zu nasalen Fasern auch nach anterior aus. Aus anterior implantierter temporaler Retina (Projektionsgebiet) richten die auswachsenden Fasern sich nach allen Richtungen aus (nicht nur nach dorsal oder ventral wie nasale Fasern in ihrem posterioren Projektionsgebiet). Dieses Ergebnis spricht, obwohl nicht sehr deutlich, auch für das erste Modell.

Die deutliche Ausrichtung der nasalen Fasern nach posterior und die weniger deutliche Ausrichtung der temporalen Fasern nach anterior sollten durch ein Experiment überprüft

werden, in dem sowohl nasale als auch temporale Fasern die Möglichkeit bekommen, sich für den anterioren oder für den posterioren Tectumpol zu entscheiden. Die Transplantate wurden zu diesem Zweck am Tag E6 in die Mitte zwischen den beiden Polen implantiert. Das Ergebnis sieht so aus: Fasern sowohl temporaler als auch nasaler Herkunft richten sich nach posterior aus. Allerdings scheint das Abbiegen von nasalen Fasern nach posterior stärker zu sein, im Vergleich zu dem Abbiegen von temporalen Fasern (vgl. Abb.18d,e und 19d). Im Sinne einer Zuordnung zu einem der beiden Modelle würde dieses Ergebnis eher für das zweite Modell sprechen (s. unten).

Dorsale und ventrale Fasern aus den jeweiligen Transplantaten zeigten keine ventrale oder dorsale Richtungspräferenz - wenn überhaupt eine Richtungspräferenz, dann eine nach posterior. Meistens wuchsen solche Fasern in alle Richtungen aus, unabhängig von der Transplantatposition (s. Erg. 7.5.).

Vergleicht man alle Transplantationsergebnisse untereinander, so wird auf den ersten Blick deutlich, daß eine Antwort auf die Frage, welches der beiden Modelle durch die Gesamtheit dieser Experimente gestützt wird, ausbleibt. Die Befunde brachten interessante Beobachtungen in bezug auf das Auswachsen von Fasern aus retinalen Transplantaten auf dem Tectum. Wahrscheinlich gibt es auf dem Tectum während der Entwicklung multifaktorielle Einflüsse auf die retinalen Fasern. Dabei weisen insbesondere die Experimente mit nasalen Transplantaten im anterioren Tectum darauf hin, daß starke, nach posterior gerichtete Kräfte auf solche Fasern

wirken. Solche nasale Fasern werden aus dorsalen oder ventralen Richtungen nach posterior gezwungen. Ähnliche Kräfte wirken sowohl auf nasale als auch auf temporale Fasern in der Mitte des Tectums, obwohl diese Kräfte für temporale Fasern deutlich schwächer zu sein scheinen.

Den Unterschied des Abbiegungsverhaltens temporaler und nasaler Fasern könnte man so interpretieren: Für beide Fasern gibt es eine allgemeine Komponente, die nach posterior gerichtet ist. Sie wirkt auf alle Fasern, denn es wurde gezeigt, daß auch dorsale und ventrale Fasern eine Präferenz in posteriore Richtung aufweisen. Diese Komponente hat einen eher unspezifischen Charakter und ist abhängig vom Differenzierungsstadium des Tectums. Das Tectum differenziert sich in einem anteroposterioren Gradienten (LaVail und Cowan, 1978; Cowan, 1978 Review). Das starke Abbiegen von nasalen Fasern nach posterior und das schwächere Ausrichten von temporalen Fasern nach anterior sprechen für zusätzliche Kräfte, die jeweils auf die auswachsenden Fasern wirken. Es kann noch nicht gesagt werden, welcher Natur solche Kräfte sind. Dazu bedarf es weiterer Experimente, die in späteren Entwicklungsstadien durchgeführt werden, wenn die Differenzierung des Tectums abgeschlossen ist. Solche Experimente bringen aber zusätzliche technische Schwierigkeiten mit sich, die bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht gelöst werden konnten. In bezug auf die von DeLong und Coulombre (1967) und von Goldberg (1974) durchgeführten Experimente kann gesagt werden, daß unsere Versuche eher die Ergebnisse von Goldberg bestätigen.

Die im Ergebnisteil 5.1. dargelegten und im Diskus-

sionsteil 3 besprochenen Daten zeigen, daß beim Eintritt der retinalen Fasern in das Tectum eine regionale Vorsortierung der Fasern in dorso-ventraler und in zentral-peripherer Richtung stattgefunden hat. Solche Ergebnisse werden vom zweiten Modell gefordert, schließen aber das erste Modell nicht aus. Der Grad der Ordnung in der Vorsortierung und die Strenge der Parallelität des Faserwachstums auf dem Tectum ist noch nicht auf dem Niveau der Einzelfasern genau untersucht. Sehr lokale Färbungen in der Retina führten während der frühen Entwicklung zu einem leicht aufgefächerten Faserverlauf auf dem Tectum (unveröffentlicht).

Gegen das zweite Modell sprechen die Beobachtungen, daß auf dem Tectum viele Fasern seitlich (dorso-ventral) wachsen. Zusätzlich spricht gegen dieses Modell der Befund, daß die unter Ergebnisse 8.2. beschriebenen "abnormalen" Fasern auf das nichtinnervierte Tectum eine dorso-ventrale Richtung auf ihr ventrales Zielgebiet hin einnehmen.

Es ist denkbar, daß in der Natur nicht eines der beiden Modelle ausschließlich verwirklicht ist, sondern beide Modelle durch die vorgeschlagenen Mechanismen an der Entwicklung der Projektion beteiligt sind.

6) Transiente Projektionen der Retina während der Entwicklung

Es ist bekannt,daß im Laufe der Emryonalentwicklung mehr Nervenzellen produziert werden als später im fertigen System funktionell notwendig sind(Rager 1980,Cowan 1978). Dieser Überschuß an embryonalen Nervenzellen beinhaltet solche Zellen,die ihre Axone in das richtige Projektionsge-

biet schicken aber unfähig sind, funktionelle Synapsen einzugehen, und solche Zellen,die ihre Axone in ein falsches Projektionsgebiet senden mit der Folge,daß sie auch absterben (Cowan 1978,Review).

In den hier beschriebenen Untersuchungen wurde die hohe Auflösung der Rhodamin-Markierungsmethode in Kombination mit der HRP-Methode verwendet,um quantitativ die Entwicklung,den Verlauf,die Quantität und die Elimination von zwei "falschen" Projektionen im retinotectalen System des Hühner-Embryos zu untersuchen (Abschn 8).

Die "normale" ipsilaterale Projektion in binocularen und monocularen Embryonen besteht aus zwei- bis viertausend Fasern aus allen vier retinalen Quadranten,die sich auf die gesamte anteriore Tectumhälfte verteilen und entlang der dorsoventralen Achse retinotop organisiert sind. Die "abnormale" ipsilaterale Projektion wird nur in monocularen Emryonen gebildet,besteht aus zehn- bis fünfzehntausend Fasern, hat ihren Ursprung in der dorsalen peripheren Retina und breitet sich nur auf der dorsalen Tectumhälfte aus. Beide Projektionen werden an den Entwicklungstagen 15 bis 16 eliminiert.

Betrachet man die Elimination der "normalen" ipsilateralen Projektion allein,so würde man vermuten,daß auf einem Tectum mit Innervation aus beiden Retinae,die Fasern um tectale Synapsenstellen kompetieren und daß die ipsilateralen Fasern nicht überleben, weil sie später als die kontralateralen Fasern an solche Stellen herankommen. Betrachtet man die Elimination beider Projektionen in den monocularen Embryonen,so wird es deutlich,daß ein solcher Kompeti-

tionsmechanismus in diesem System nicht ausschlaggebend sein kann. Denn es werden die ipsilateralen Fasern eliminiert ohne die Präsenz von kontralateralen Fasern. Eine mögliche Erklärung für die Elimination ist die Annahme einer spezifischen Interaktion zwischen Zellen des Tectums und retinalen Fasern. Diese Interaktion kann darin bestehen,daß das rechte und das linke Tectum in der Embryonalentwicklung als "rechts" und "links" markiert sind, um solchen fehlgeleiteten ipsilateralen Fasern keine "Chance" zur Synapsenbildung zu geben. Eine Synapsenbildung von ipsilateralen Fasern würde für das funktionelle optische System des adulten Huhns eine visuelle Unschärfe bedeuten,da sich die Gesichtsfelder der beiden Augen nicht überlappen, während die neuronalen Verbindungen der Retina überlappen würden. Eine alternative Erklärung wäre, daß die Tecta zwar nicht als "rechts" oder "links" markiert sind, daß aber innerhalb eines Tectums die ipsilateralen Fasern ihr Projektionsgebiet nicht erreichen können. Gegen diese Erklärung spricht der Befund, daß in einäugigen Embryonen sich neben der "abnormalen" eine "normale" ipsilaterale Projektion entwickelt, die auch abstirbt, obwohl hier die ipsilateralen Fasern möglicherweise ihre Projektionsgebiete erreichen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine neue neuroanatomische Färbemethode der bidirektionalen vitalen Fluoreszenzmarkierung des embryonalen retinotectalen Systems mit dem Farbstoff Rhodamin-B-Isothiocyanat entwickelt zu zur Klärung einiger entwicklungsbiologischer Aspekte des retinotectalen Systems eingesetzt.

Die Axone der retinalen Ganglienzellen sind in der kontralateralen retinotectalen Bahn des Hühner-Embryos retinotop organisiert. Axone aus der dorsalen und ventralen Retinahälfte kreuzen jeweils zu ventralen und dorsalen Teilen der visuellen Bahn und erreichen ihre entspechenden Projektionsgebiete auf dem Tectum. Die zentralen Axone der Retina liegen in der visuellen Bahn mehr zentral und in der retinalen Faserschicht auf dem Tectum (Stratum opticum) tief, während die peripheren Axone der Retina peripher in der visuellen Bahn bleiben und die äußeren Teile des Stratum opticum bilden.

Im visuellen System des Huhns wird während der Embryonalentwicklung normaler Embryonen zusätzlich zur permanenten kontralateralen eine transiente ipsilaterale retinotectale Projektion angelegt. Diese aus wenigen Axonen bestehende Projektion hat ihren Ursprung in der zentralen Retinahälfte, ist entlang der dorsoventralen Retina-Achse retinotop organisiert und wird in der späten Embryonalentwicklung völlig eliminiert. Im visuellen System von experimentell hergestellten einäugigen Embryonen wird vom verbleibenden Auge zusätzlich zur "normalen" ipsilateralen Projektion eine

"abnormale" ipsilaterale Projektion entwickelt. Beide ipsilateralen Projektionen werden in den einäugigen Embryonen zum gleichen Zeitpunkt eliminiert. Aus diesen Experimenten wurde gefolgert, daß Kompetition um Synapsenstellen nicht als der alleinige Mechanismus der Elimination von "falschen" Projektionen betrachtet werden kann.

Ein transientes afferentes Faserbündel verläuft während der Entwicklung zum posterioren Mittelhirn, wo sich der mit den amakrinen Zellen der Retina verbundene isthmo-optische Nucleus befindet. Die Rolle dieser Projektion ist noch unverstanden.

Es wurden Versuche zur Frage nach der Wegfindung von Axonen auf dem Tectum durchgeführt. Nach experimenteller Ablenkung wachsender Fasern wurde deren weiterer Verlauf beobachtet. Abgelenkte Axone können ein mechanisches Hindernis umgehen und ihre vorherige Richtung und möglichrweise ihre vorbestimmte Bahn wieder einnehmen. Auswachsende Fasern aus retinalen Transplantaten zeigen unterschiedliches Wachstumsverhalten auf nichtinnerviertem Tectum. Nasale Fasern richten sich auf dem Tectum zu ihrem Projektionsgebiet hin. Temporale Fasern zeigen eine weniger deutliche Ausrichtung zu ihrem Projektionsgebiet. Dorsale und ventrale Fasern richten sich nicht zu ihren Projektionsgebieten hin und zeigen, wenn überhaupt, eine Ausrichtung nach posterior.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Albus, K. (1975): A quantitative study of the projection of the central and paracentral field in the area 17 of the cat.I.The precision of the topography.Exp.Brain Res.24, 159-179.

Auerbach, R., L. Kubai, D. Knighton and J. Folkman (1974): A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos.Dev.Biol. 41, 391-394.

Bonhoeffer,F. und J.Huf (1980): Recognition of cell types by axonal growth cones in vitro.Nature (Lond.) 288, 162-164.

- (1982): In vitro experiments on axon guidance demonstrating an anterior-posterior gradient on the tectum.The EMBO Journal 1, 427-431.

Bentivoglio, M., H.G.J.M.Kuypers, C.E.Catsman-Berrevoets, H.Loewe and O.Dann (1980): Two new fluorescent neuronal tracers which are transported over long distances.Neurosci.Lett.18, 25-30

Bodian, D.(1937): The staining of parrafin sections of nervous tissues with activated protargol.The role of fixatives.Anat.Rec.69,153-162.

Clarke, P.G.H. und D. Whitteridge (1976: The projection retina,including the "red area" on to the optic tectum of the pigeon.Quart.J.Exp.Physiol. 61, 351-358.

Clarke, P.H.G, L.A.Rogers and W.M.Cowan (1978): The time of origin and pattern of survival of neurons in the isthmooptic-nucleus in the chick. J.Comp.Neurol. 167, 125-142.

Clarke, P.G.H. and W.M.Cowan (1978): The development of the isthmooptic tract in the chick, with special reference to the occurance and correction of developmental errors in the location and connections of the isthmooptic neurons. J.Comp.Neurol. 167, 143-164.

Claviez, M. (1981): Kultur embryonaler Hühnchen Retina: Eigenschaften auswachsender Neuriten und ihre wechselwirkung mit der Umgebung. Dissertation,Universität Tübingen.

Cook, J.E. and I.J. Horder (1977): The multiple factors determining retinotopic order in the growth of optic fibers into the optic tectum. Philos.Trans.R.Soc. Lond.(Biol.) 278, 261-276.

Cowan, W.M., L.Adamson and T.P.S.Powell (1961): An experimental study of the avian visual system. J.Anat.(Lond.) 95, 545-562.

Cowan, W.M. (1978): Aspects of neural development.In: Int. Rev. Physiol. Vol.17,Neurophysiology III (R.Porter,ed.) pp. 149-191, Baltimore: University Park Press.

Cowan, W.M. (1970): Centrifugal fibers in the avian brain.Br.med.Bull.26, 112-118.

Crossland, W.J., W.M.Cowan and L.A.Rogers (1975): Studies on the development of the chick optic tectum.IV.Autoradiographic study of the development of retino-tectal connections. Brain Res. 91, 1-23.

Crossland, W.J. and C.J.Ushwat (1979): Topographic projections of the retina and optic tectum upon the ventral lateral geniculate nucleus in the chick. J.Comp.Neurol. 185, 87-106.

De Gennaro, L.D., D.S.Packard jr., R.W.Stach and B.J.Wagner (1980): Growth and differentiation of chicken embryos in simplified shell-less cultures under ordinary conditions of incubation.Growth 44, 343-354.

DeLong, G.R. and A.J.Coulombre (1965): Development of the retino-tectal topographic projection in the chick embryo. Exp.Neur.13, 351-363.

- (1967): The specificity of retinotopic connections studied by retinal grafts onto the tectum in chick embryos.Dev.Biol.16, 513-531.

Fawcett, J.M. (1980): How axons grow down the Xenopus optic nerve.JEEM 65,219-233.

Forsman, J. (1900): Über die Ursachen,welche die Wachstumsrichtung der peripheren Nervenfasern bei der Regeneration bestimmen.(Ziegler´s) Beitr.Path.An.Allg.Path. 24, 56-100

Fraser, S.E.(1980): A differential adhesion approach to the patterning of nerve connections.Dev.Biol. 79, 453-464.

Fujisawa, H., K.Watwnabe, T.Noboru and Yibata(1981): Retinotopic analysis of fiber pathways in amphibians.II.The frog Rana nigromaculata.Brain Res. 206, 21-26.

Fujisawa, H., S.Thanos and U.Schwarz (1983): Faktors responsible for the development of the retinot-tectal projection in the chick-embryo (sub.f.publication).

Gierer, A.(1981): Development of projections between areas of the nervous system.Biol.Cyber. 42, 69-78.

Goldberg, S.(1974): Studies on the mechanics of the development of the visual pathways in the chick embryo.Dev. Biol. 36, 24-43.

Goldberg, S. and A.J.Coulombre (1972): Topographical development of the ganglion cell fiber layer in the chick retina. A whole mount study.J.Comp.Neurol. 146,507-518.

Grafstein, B. and D.S. Forman. (1980): Intracellular transport in neurons.Phys.Rev.60, 1167-1283.

Halfter, W., M. Claviez and U. Schwarz (1981): Preferential adhesion of tectal membranes to anterior embryonic chick retina neurites. Nature 292, 67-70

Hamburger, V. and H.L.Hamilton (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo.J.Morph.88, 49-92.

Henke-Fahle, S. (1983): Monoklonale Antikörper gegen Oberflächenkomponenten neuronaler Zellen. Dissertation, Universität Tübingen.

Horder,T.J., A.Mashkas and A.J.Pilgrim(1979): A method for the determination of fibre organisation within the visual pathways of higher vertabrates.J.Physiol.(Lond.) 296, 8P.

Horton, J.C., M.M.Greenwood and D.H.Hubel (1979): Nonretinotopic arrangment of fibres in cat optic nerve.Nature (Lond.) 28a, 720-722.

Huber, G.C. and E.C. Crosby (1929): The nuclei and fibre paths of the avian diencephalon, with consideration of telencephalic and certain mesencephalic centres and connections.J.Comp.Neurol.48, 1-225.

Jacobson, M.(1978): Developmental Neurobiology.New York, London: Plenum Press.

Kahn, A.J.(1973): Ganglion cell formation in the chick neural retina.Brain Res. 63, 285-290.

Kern-Veits, B.(1981): Auswachsen von retinalen axonen in vitro: Regionalspezifisches Erkennen von Zellmembranen durch retinale axone in vitro. Diplomarbeit, Universität Hohenheim.

Kuypers, H.G.J.M., M.Bentivoglio, D.van der Kooy and C.E. Catsman-Berrevoets (1979): Retrograde transport of bisbenzidine and propidium jodide through axons to their parent cell bodies.Neurosc.Lett. 12, 1-7.

Land, P.W. and R.D.Lund (1979): Development of the cat s uncrossed retinotectal pathway and its relation to plasticity studies.Science 205, 698-700.

LaVail, J.H. and W.M. Cowan (1971). The development of the chick optic tectum. II. Autoradiographic studis. Brain Res. 28, 421-441.

LaVail, J.H. and M.M.LaVail (1974): The retrograde intra-axonal transport of horsradish peroxidase in the chick visual system: A light and electron microscopic study. J.Comp.Neurol. 157, 303-358.

Loeb, L. (1902): Ueber das Wachstum des Epithels. Arch. Entw. Mech. Organ. 13, 487-506.

Lund, R.D., P.W.Land and J.Boles (1980): Normal and abnormal uncrossed retinotectal pathways in cats.An HRP study in adults.J.Comp.Neurol. 189, 711-720.

Lund, R.D (1975): Variations in the laterality of the central projections of retinal gangiion cells.Exp.Eye Res. 21, 193-203.

Lund, R.D., T.J.Cunningham and J.S.Lund (1973): Modified optic projections after unilateral eye removal in young rats.Brain behav. and Evol. 8, 51-72.

McGillJ.I., T.P.S.Powell and W.M.Cowan (1966): The retinal representation upon the optic tectum and isthmooptic nucleus in the pigeon.J.Anat.100, 5-33.

McLoon, S.C. and R.D.Lund (1982): Transient retinofugal pathways in the developing chick.Exp. Brain Res. 45, 277-284.

O´Leary, D.D.M. and W.M. Cowan (1980): Observations on the effects of monocular and binocular enucleation on the development of the chick visual system. Soc. Neurosci. Abtr.6, 297.

Perlia, R. (1889): Über ein neues opticuscentrum beim Huhne. v.Graefes Arch.f.Ophthalm.35, Abt.1, 20-24.

Polyak, S. (1957): The vertebrate visual system.Chicago University Press.

Raffin, J.P. (1975): Ipsilateral optic pathways in uni-ophthalm chicken (Gallus domesticus).Exp.Brain Res. Suppl.to 23, 168

Rager, G and U.Rager (1976): Generation and degeneration of retinal ganglion cells in the chicken.Exp.Brain Res. 25, 551-553.

Rager, G. and B.von Oeynhausen (1979): Ingrowth and ramification of retinal fibers in the developing optic tectum of the chick embryo.Exp.Brain Res. 35, 213-217.

Rager, G.(1980): Die Ontogenese der retinotopen projektion. Naturwissenschaft.67, 280-287.

Ramon y Cajal, S.(1910): Alpuras observationes favorables a la hipotesis neurotropica.Trabajos Lob.Invest. Biol. Univ.Madrid 8, 63-164.

Ramon y Cajal, S. (1972): The structure of the retina.Edited by Thomas, Springfield-Illinois.

Rogers, K.T. (1960): Studies on the chick brain of biochemical differentiation related to the morphological differentiation.I.Morphological development.J.Exp.Zool. 144, 77-87.

Scalia, F. and K.Fite (1974): A retinotopic analysis of the central connections in the optic nerve of the frog. J.Comp.Neurol. 158, 455-478.

Schmidt, J.T. (1982): The formation of retinotectal projections.TINS Apr.'82, 111-115.

Scholes, H.J. (1979): Nerve fiber topography in the retinal projection to the tectum. Nature (Lond.) 278, 620-624.

Sharma, S.C. (1972): The retinal projections in the goldfish: An experimental study.Brain Res. 39, 213-223.

Sohal, S. and C.H.Narajanan (1974): The role of afferent input on the development of the isthmooptic nucleus. Anat.Rec. 178, 207-239.

Sperry, R.W. (1963): Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. PNAS, USA 50, 703-710.

Stretton, A.O.M. and E.A.Kravitz (1968): Neuronal geometry: Determination with atechnique of intracellular dye injection.Science 162, 132-134.

Thanos, S. (1980): Lebensdauer von Kaninchen-Antikörpern in Hühner-Embryonen. Diplomarbeit, Universität Tübingen.

Thanos, S. and F. Bonhoeffer (1983): Investigations on the develoment and topographic order of retinotectal axons: Anterograde and retrograde staining of axons and their perikarya with rhodamine in vivo.(sub.f.publication).

Weiss, P. (1941): Nerve patterns: The mechanics of nerve growth. Third Growth Symp.5, 163-203.

Wallenberg, A. (1898): Das mediale Opticusbündel der Taube. Neurol.Zbl.17, 532-537.

Willshaw, D.J. and C.v.d.Malsburg (1979): A marker induction mechanism for the establishment of ordered neural mappings.Phil.Trans.R.Soc.Lond.B 287, 203-243.

LEBENSLAUF

Am 1. November 1954 wurde ich, Solon Thanos, als Sohn des Landwirtes Sotirios Thanos und seiner Ehefrau Eleftheria Thanos in Paleokaria (Griechenland) geboren. 1960 bis 1966 besuchte ich die Grundschule in Paleokaria, dann das Gymnasium in Pyli, an dem ich im Juli 1972 das Abitur bestand. Im Juli 1972 kam ich in die Bundesrepublik Deutschland, wo ich mich seitdem aufhalte. Von 1975 an studierte ich Biologie an der Universität Bielefeld, bestand im Sommer 1977 die Vordiplomprüfung und wechselte zum Wintersemester 78/79 zur Universität Tübingen über, an der ich das Hauptstudium der Biologie fortsetzte und mit der Diplomprüfung im Hauptfach Mikrobiologie im Juli 1980 abschloß. Im Wintersemester 78/79 nahm ich das Studium der Humanmedizin auf und führte es mit Genehmigung der Dekane für Biologie und Medizin als Doppelstudium durch. Das Studium der Medizin habe ich noch nicht beendet, das Wintersemester 82/83 ist mein viertes klinisches Semester. Die Diplomarbeit für Biologie führte ich 1979 bis 1980 am Max-Planck-Institut für Virusforschung unter Anleitung von Dr. Friedrich Bonhoeffer durch. Von August 1980 bis Februar 1983 arbeitete ich an meiner Dissertation am selben Institut.

Meine akademischen Lehrer waren:

In Bielefeld: P. Görner, K. Immelmann, P.v. Sengbusch.

In Tübingen (Biologie): W.Bessler, F.Bonhoeffer, V.Braun, D.Dütting, A.Gierer, K.Hantke, P.Hausen, V.Hemleben, R.Jacob, W.Löffler, W.Pfeiffer, H.Probst, W.Seyffert, K.Wöhrmann, H.Zähner.